



**Titre:** Étude du métabolisme énergétique des cellules mammifères CHO à titre d'indicateur de croissance et de productivité

**Auteur:** Virginie Mc Murray-Beaulieu

**Date:** 2006

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Mc Murray-Beaulieu, V. (2006). Étude du métabolisme énergétique des cellules mammifères CHO à titre d'indicateur de croissance et de productivité [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
Citation: <https://publications.polymtl.ca/7852/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/7852/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:**  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**ÉTUDE DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DES CELLULES  
MAMMIFÈRES CHO À TITRE D'INDICATEUR DE CROISSANCE ET DE  
PRODUCTIVITÉ**

**VIRGINIE MC MURRAY-BEAULIEU  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
DÉCEMBRE 2006**



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-25559-9*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-25559-9*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

Ce mémoire intitulé :

**ÉTUDE DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DES CELLULES  
MAMMIFÈRES CHO À TITRE D'INDICATEUR DE CROISSANCE ET DE  
PRODUCTIVITÉ**

présenté par : MC MURRAY-BEAULIEU Virginie

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph.D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et co-directeur de recherche

M. BUTLER Michael, Ph.D., membre

## DÉDICACE

*« C'est le signe d'un fou, qu'avoir honte d'apprendre. »*

*À Flore qui vécut 98 ans*

*À France qui n'aura jamais 30 ans*

## REMERCIEMENTS

Je remercie mon Directeur de recherche Mario Jolicoeur qui, en Suisse ou au 2082-JAB, est toujours demeuré disponible, ainsi que mon Co-Directeur Michel Perrier pour son support discret et constant. Merci aussi de m'avoir permis de faire partie du groupe CellNet, riche en savoir et en ressources.

Je remercie également le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour le financement du matériel de laboratoire et l'octroi d'une bourse d'études.

Merci sincère à mes collègues du groupe de recherche, Éric Boivin, Mathieu Cloutier, Anne Gigout, Audrey Fazzi, Frédéric Poulin, Cyril Boucher, Marisha Ben-Tchavtchavadze et Azadeh Kermanshahpour pour l'atmosphère joyeuse et agréable de travail, pour nos fréquentes soirées et surtout pour nos congrès jamais sans aventure. Merci spécial aux associés de recherche Steve Hisiger et Jingkui Chen sans qui je n'y serais jamais parvenue!

Merci aux stagiaires et PFE, tout particulièrement Caroline Durand, pour l'aide apportée à travers leurs travaux.

Merci également aux professeurs, techniciens et secrétaires du département de Génie Chimique.

Merci à ma famille, ma belle-famille et mes amis pour m'avoir encouragée à persévérer dans les instants de doute et tenté de comprendre (ou faire semblant de comprendre) ce que je faisais. Merci à David d'avoir tout simplement été là pour moi et merci à tes bras si accueillants.

Merci finalement à mes petites cellules capricieuses et boudeuses pour votre coopération en échange de petites attentions.

## RÉSUMÉ

La production de composés à fonction thérapeutique par la culture en bioréacteur de cellules animales génétiquement modifiées est déjà rencontrée à des échelles industrielles. L'emploi de cellules eucaryotes offre l'avantage de produire des molécules plus complexes, notamment des protéines ayant des patrons de repliement et de glycosylation adéquats pour leur fonctionnement et non synthétisables par des bactéries. Toutefois, les faibles densités cellulaires obtenues ainsi que les pertes de viabilité limitent les niveaux de production atteints. Alors que les approches classiques d'optimisation associent généralement les cellules à des boîtes noires, des champs de recherche prometteurs s'appuient sur le principe qu'un accroissement de la production requiert d'abord une meilleure compréhension des phénomènes intracellulaires.

L'identification d'un état physiologique souhaitable pour une culture, celui pour lequel la production est maximale par exemple, conduirait à l'élaboration de stratégies d'optimisation et de contrôle permettant l'atteinte et le maintien de cet état. La problématique réside alors dans sa définition par des mesures adéquates. Le suivi des nucléotides, indicateurs potentiels de l'état physiologique, s'inscrit dans cette démarche. Ces derniers remplissent plusieurs fonctions essentielles aux systèmes biologiques. Ils agissent à titre de donneurs ou de précurseurs dans les métabolismes des acides nucléiques et énergétique et ont des fonctions régulatrices dans plusieurs voies cellulaires.



Ce projet de maîtrise vise ainsi, dans un premier temps, l'étude de liens possibles entre les états physiologiques et les potentiels cellulaires de croissance et de production en biomolécule d'intérêt. Dans un deuxième temps, il s'agit d'identifier l'état physiologique permettant une productivité spécifique cellulaire optimale par le suivi du métabolisme énergétique. Cette étude porte sur des cellules mammifères CHO (Chinese Hamster Ovary) modifiées génétiquement par l'insertion du gène de t-PA humain (tissue plasminogen activator) et cultivées en flacons de type « T-flasks » et en bioréacteur. Cette lignée cellulaire a été sélectionnée pour sa large utilisation industrielle, alors que le t-PA sert à titre de glycoprotéine modèle. Cette maîtrise s'insère dans les travaux du Réseau de recherche en biotransformation cellulaire (CellNet), un consortium national de scientifiques et de partenaires industriels financé par le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

Le suivi des métabolites extracellulaires a nécessité l'adaptation des méthodes de mesure aux conditions du laboratoire. Dans un premier temps, les protocoles de culture des cellules CHO et la méthode d'extraction pour mesurer les nucléotides ont été établis. Les essais de rendement ont montré qu'une double extraction sur un culot cellulaire frais non lavé avec une solution saline permettait d'obtenir des rendements d'extraction satisfaisants.

Afin d'étudier les relations potentielles entre les états énergétiques cellulaires et la productivité en t-PA, des perturbations ciblées ont été apportées à des cultures cellulaires

en suspension. L'ajout de butyrate de sodium a été sélectionné pour les aptitudes de ce composé, tel que présenté dans la littérature, à inhiber la croissance cellulaire tout en augmentant la productivité spécifique. Des tests ont été effectués en T-flasks et en bioréacteur de 3,5L. Les essais en T-flasks ont visé à déterminer la concentration en butyrate de sodium permettant un accroissement de la productivité tout en minimisant l'impact sur la croissance cellulaire. Pour ce faire, des ajouts de 0 mM (contrôle), 1mM, 3mM et 5mM ont été réalisés après 48h et 72h de culture. Une concentration de 1mM a permis d'accroître la productivité spécifique tout en ayant un effet minimal sur la croissance cellulaire.

Suite à ces essais préliminaires, trois cultures en bioréacteur ont été réalisées en mode cuvée. La première expérience a consisté en une culture contrôle. Par la suite, deux cultures avec des injections de 1mM de butyrate de sodium après 48h ou 74h de culture ont été effectuées. Pour chaque cas, le métabolisme énergétique et la productivité ont été suivis. Les cultures avec ajout de butyrate de sodium ont atteint des densités cellulaires finales plus basses, mais ont permis un accroissement de la productivité spécifique par un facteur allant jusqu'à 1,5. Au niveau énergétique, des hausses en nucléotides triphosphates, ADP, AMP et UDP-hexoses ont été observées après les ajouts de butyrate de sodium. S'en est suivi une stabilisation de l'activité métabolique des cellules caractérisée par un état énergétique élevé jusqu'à la baisse de viabilité.

Des auteurs ayant suggéré des variations possibles de la taille des cellules en période de stress, des ratios énergétiques ont également été considérés afin d'éliminer l'influence des tailles cellulaires sur l'analyse des résultats. Pour les trois cultures en bioréacteur, la charge énergétique des cellules, définie par un ratio des nucléotides adénines, est demeurée stable. Par contre, l'inhibition de la synthèse de l'ADN semble avoir affecté le ratio UTP/ATP et le pourcentage total en purines et pyrimidines. Ces ratios, sensibles aux changements, pourraient donc être de bons indicateurs du métabolisme cellulaire. D'autre part, la hausse jumelée en métabolites énergétiques et de la productivité spécifique observée suite à l'ajout de butyrate supporte l'hypothèse d'une association entre la productivité cellulaire et l'état énergétique. Par contre, l'interférence d'un second phénomène propre aux trois cultures, possiblement une limitation en nutriments essentiels dans le milieu, semble être démontrée par des similitudes entre certains paramètres, notamment les variations en pourcentage total en purines et pyrimidine et l'atteinte de la productivité maximale. La culture ayant reçu un ajout plus tôt (48h) se démarque toutefois de la culture contrôle et de celle ayant reçu un ajout en fin de phase exponentielle de croissance (74h), ce qui suppose qu'un ajout tardif affecte moins le métabolisme cellulaire. Le ratio UTP/ATP et le taux de consommation en glucose sont notamment davantage perturbés pour la culture avec ajout à 48h.

L'ajout de butyrate de sodium a également influencé les taux de respiration spécifiques ( $qO_2$ ) et les niveaux de NAD(P)H intracellulaires tel que suivis par une sonde à fluorescence. Un accroissement soudain des  $qO_2$  immédiatement après les additions de

butyrate de sodium en bioréacteur et son maintien à une valeur élevée suggère une activité métabolique élevée. De même, alors que les signaux bruts de fluorescence de NAD(P)H corrélaient les données de comptes cellulaires pour les cultures non perturbées, un net écart a été observé pour les cultures avec ajout de butyrate de sodium. Reportée par million de cellules, la hausse des signaux de NAD(P)H spécifiques pour les cultures perturbées pourrait indiquer un accroissement de l'énergie cellulaire suite à l'arrêt de la réplication de l'ADN.

Finalement, une perte en concentration en t-PA actif ayant été observée lors des cultures en bioréacteur, des essais ont été réalisés pour en établir la cause. Ces essais ont mis en évidence une production accrue des cellules cultivées en T-flasks par rapport à celles en réacteur, mais n'ont pas permis d'identifier la source d'inactivation/dégradation. L'action de protéases et l'adsorption de t-PA sur les parois en acier inoxydable de la cuve ont toutefois été éliminées. Des essais plus poussés devraient être faits pour déterminer si une relation existe entre l'agitation ou la concentration en oxygène dissous et la qualité des protéines produites.

## ABSTRACT

The production of therapeutic compounds by bioreactor cultures of genetically modified animal cells is already met on industrial scales. The use of eucaryotic cells offers the advantage of producing more complex molecules, primarily proteins having functional folding and glycosylation patterns, which are modifications that are unfeasible by bacteria. However, the low cellular densities obtained as well as diminished cell viability limit the levels of production reached. Whereas the traditional approaches of optimization generally consider the cells as black boxes, promising research fields are based on the principle that maximizing production requires a better understanding of the cellular metabolism.

The identification of a desirable physiological state for a culture for which the production is maximum can lead to the development of optimization and control strategies allowing for the maintenance of this state. The problems lie then in its characterization by choosing adequate measurements. The monitoring of nucleotides, potential indicators of the physiological state, falls under this approach. The latter fulfill several essential functions in the cells biological systems. They act as donors or precursors in energy and nucleic acid metabolisms and have regulating functions in several cellular pathways.

This Master's project aims thus principally at studying the possible links between physiological states and cellular growth and production potentials. Secondly, the

objective is to identify the physiological state which allows for an optimal cellular specific productivity by monitoring the energy metabolism of the cells. This study utilizes CHO (Chinese Hamster Ovary) mammalian cells, which have been genetically modified by the insertion of the human t-PA gene (tissue plasminogen activator) and cultivated in T-flasks and a bioreactor. This cell line was selected for its broad industrial use, whereas t-PA was used as a model glycoprotein. This Master's is part of the Cell-Factory Bioprocessing Research Network (CellNet), a national consortium of scientists and industrial partners funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

To monitor the extracellular metabolites, the measurement methods were adapted first to meet the specific requirements of the laboratory. Cell culture protocols and extraction methods were established. Data showed that a double extraction on a fresh pellet without saline solution washes gave good extraction results.

In order to study the possible relationship between the cellular energy state and the t-PA productivity, targeted disturbances were administered to the suspension cell cultures. The addition of sodium butyrate was selected due to its characteristics, as presented in the literature, to inhibit cell growth while increasing specific productivity. Tests were carried out in T-flasks and in a 3,5L-bioreactor. The tests in T-flasks were aimed at determining the concentration of sodium butyrate required to increase productivity, while minimizing the impact on the cell growth. With this intention, additions of 0mM

(control), 1mM, 3mM and 5mM were carried out after 48h or 72h of culture. A concentration of 1mM lead to increased specific productivity while having a minimal effect on the cell growth.

Following these preliminary tests, three batch bioreactor cultures were carried out. The first culture consisted of a control. Thereafter, two cultures with injections of 1mM of sodium butyrate at 48h and 74h were carried out. For each culture, the energy metabolism and the productivity were followed. The cultures with addition of sodium butyrate reached lower final cellular densities, but allowed an increase in the productivity by a factor of 1,5. As regards to the energy metabolism, nucleotide triphosphates, ADP, AMP and UDP-hexoses, increased following the addition of sodium butyrate to the culture medium. It appears that the cells entered a stability phase characterized by a high energy state until the loss of viability.

Previous authors have suggested possible variations of the cell sizes in period of stress. Therefore, energy ratios were also considered in order to eliminate the influence of cellular sizes on the analysis of the results. For the three bioreactor cultures, the energy charge of the cells, defined by a ratio of the adenine nucleotides, remained stable. On the other hand, inhibition of DNA synthesis, observed by the decrease in cellular density, seems to have affected UTP/ATP ratio as well as the percentage of pyrimidines versus purines. These ratios could thus be good indicators of the cellular metabolism. In addition, the combined rise in energy metabolites and specific productivity observed

following the addition of sodium butyrate supports the assumption of an association between the cellular productivity and the cell energy state. However, similarities between the variations of certain parameters, such as the percentage of pyrimidines versus purines and the time required for maximum productivity, also seems to show the interference of a second phenomenon specific to the three cultures, possibly a limitation in essential nutrients in the medium. The culture which received an earlier addition of sodium butyrate (48h) differs more from the control culture compared the culture which received an addition at the end of the exponential phase (74h). It implies that a late addition affects the cellular metabolism less.

The addition of sodium butyrate also influenced the specific oxygen uptake rate ( $qO_2$ ) and the levels of intracellular NAD(P)H as followed by a fluorescence probe. A sudden increase in the  $qO_2$  immediately after the additions of sodium butyrate in the bioreactors suggests a high metabolic activity in the TCA. In the same way, whereas the raw NAD(P)H fluorescence signals correlate the data of cellular growth for the nondisturbed culture, a net deviation is noted for the cultures with addition of sodium butyrate. The rise of the specific NAD(P)H signals for the disturbed cultures could indicate an increase in cellular energy caused by DNA replication arrest.

Finally, a reduction in the active t-PA concentration having been observed during the bioreactor cultures, tests were carried out to establish the cause. These tests highlighted an increased production for the cells cultivated in flasks compared to those grown in



bioreactor, but did not allow to identify the source of the inactivation/degradation of the protein. The action of proteases and the adsorption of t-PA on the stainless steel surface of the vessel were however excluded. More tests should be carried out to determine if a relationship exists between agitation or dissolved oxygen concentration and the quality of proteins produced.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>DÉDICACE .....</b>	<b>IV</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>V</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XXIV</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>XXVII</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XXVIII</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1. PROBLÉMATIQUE.....	1
1.2. OBJECTIFS .....	4
1.3. STRUCTURE DU MÉMOIRE.....	4
<b>CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>6</b>
2.1. TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT .....	6
2.1.1. Activateur du plasminogène humain (Tissue plasminogen activator) .....	7
2.2. CULTURE DES CELLULES MAMMIFÈRES .....	11
2.2.1 Conditions de culture .....	11

2.2.2. Mode de cultures .....	13
2.2.3. Suivi des cultures .....	15
2.2.4. Métabolisme énergétique .....	17
2.2.4.1. Les molécules énergétiques.....	17
2.2.4.2. Réseau réactionnel du métabolisme des cellules animales .....	22
2.2.4.3. État énergétique cellulaire et la productivité.....	24
2.2.4.4. État énergétique cellulaire face au stress .....	25
2.3. APPROCHE PERMETTANT L'ACCROISSEMENT DE LA PRODUCTIVITÉ.....	30
2.3.1. Effet du butyrate de sodium sur les cellules mammifères .....	31
2.3.1.1. Mode d'action .....	32
2.3.1.2. Emploi pour la production de protéines recombinantes.....	35
<b>CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>36</b>
3.1. CULTURE CELLULAIRE .....	36
3.1.1. Lignées cellulaires.....	36
3.1.2. Passage et essais préliminaires.....	36
3.1.3. Bioréacteur .....	37
3.1.3.1. Système .....	37
3.1.3.2. Inoculum .....	37
3.1.3.3. Échantillonnage.....	38
3.2. RÉACTIFS .....	38
3.2.1. Standards de nucléotides .....	38
3.2.2. Autres .....	38

3.3. MÉTHODE ANALYTIQUE .....	39
3.3.1. Extraction des nucléotides.....	39
3.3.2. Mesure des nucléotides par HPLC-MS.....	39
3.3.3. Mesure de fluorescence.....	40
3.3.4. Compte cellulaire et viabilité .....	41
3.3.5. Mesure de la concentration en glucose extracellulaire .....	41
3.3.6. Mesure de la concentration en glutamine extracellulaire.....	41
3.3.7. Mesure de la concentration en lactate extracellulaire .....	42
3.3.8. Mesure de la concentration en ammoniacque extracellulaire .....	42
3.3.9. Mesures des anions et des cations extracellulaires .....	43
3.3.10. Mesure de la concentration en t-PA actif.....	43
 <b>CHAPITRE 4 : ÉTUDE DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE À TITRE</b>	
<b>D'INDICATEUR DE LA PRODUCTIVITÉ DES CELLULES CHO PAR DES</b>	
<b>AJOUTS DE BUTYRATE DE SODIUM.....</b>	<b>44</b>
4.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE .....	44
4.2. NA-BUTYRATE ENHANCES CHO CELLS METABOLIC STATE STABILITY AND	
RECOMBINANT T-PA PRODUCTIVITY .....	44
4.2.1. Abstract .....	44
4.2.2. Introduction.....	45
4.2.3. Experimental .....	47
4.2.3.1. Cell line and culture medium.....	47
4.2.3.2. T-flask cultures.....	48

4.2.3.3. Bioreactor cultures .....	48
4.2.3.4. Assays .....	49
4.2.3.5. Specific Oxygen Uptake Rate .....	50
4.2.3.6. Analysis of Nucleotides .....	50
4.2.3.7. Multiwavelength fluorescence measurements .....	52
4.2.4. Results and Discussion.....	52
4.2.4.1. 1 mM Na-butyrate Inhibits Cell Growth and Enhances t-PA Production .....	52
4.2.4.2. Na-butyrate Addition Enhances Cell Metabolic Activity .....	60
4.2.4.3. Analysis of nucleosides and nucleotides ratios.....	68
4.2.4.4. The Cells Energetic Capacity Reflects the Productivity Potential for t-PA .....	71
4.2.5. Conclusion .....	73
4.2.6. Nomenclature .....	75
4.2.7. Acknowledgment .....	76
4.2.8. References .....	76
<b>CHAPITRE 5 : SUIVI PAR SONDE À FLUORESCENCE À LONGUEURS D'ONDES MULTIPLES.....</b>	<b>85</b>
5.1. INTRODUCTION.....	85
5.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	86
5.2.1. Mesure de fluorescence sur des milieux avec et sans rouge de phénol .....	86

5.2.2. Signaux de fluorescence du NADPH des cultures CTRL, NaBu-48h et NaBu-74h.....	88
5.2.3. Signaux de fluorescence du tryptophane et de la riboflavine des cultures CTRL, NaBu-48h et NaBu-74h .....	90
5.3. CONCLUSION .....	91
<b>CHAPITRE 6 : INACTIVATION DU T-PA.....</b>	<b>93</b>
6.1. INTRODUCTION.....	93
6.2. CHOIX DES ESSAIS .....	93
6.3.1. Démarche expérimentale.....	95
6.3.2. Objectif.....	96
6.3.3. Résultats et discussion .....	96
6.4. PRODUCTION EN T-FLASKS VERSUS EN BIORÉACTEUR.....	98
6.4.1. Démarche expérimentale.....	98
6.4.2. Objectif.....	99
6.4.3. Résultats et discussion .....	99
6.5. AGITATION .....	101
6.5.1. Démarche expérimentale.....	101
6.5.2. Objectif.....	101
6.5.3. Résultats et discussion .....	101
6.6. ADSORPTION DE SURFACE .....	102
6.6.1. Démarche expérimentale.....	103
6.6.2. Objectif.....	103

6.6.3. Résultats et discussion .....	103
6.7. OXYGÈNE DISSOUS .....	104
6.8. CONCLUSION .....	105
<b>CHAPITRE 7 : DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>106</b>
<b>CHAPITRE 8 : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>110</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>113</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>131</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 2.1 Fonctions des métabolites énergétiques principaux .....	20
Tableau 2.2 Les ratios énergétiques comme indicateur de certaines relations du métabolisme énergétique.....	21
Tableau 6.1 Caractéristiques des cultures statiques (T-flasks ou plaque multi-puits), en spinner ou en bioréacteur .....	94



## **LISTE DES FIGURES**

Figure 2.1 Voie fibrinolytique.....	9
Figure 2.2 Activateur du plasminogène tissulaire.....	10
Figure 2.3 Représentation schématique simplifiée du réseau de réactions du métabolisme d'une cellule animale .....	22
Figure 2.4 Nucléosome .....	33
Figure 4.1 Cell concentration (A-D), cell viability (B-E) and t-PA concentration (C-F) in t-flask cultures.....	54
Figure 4.2 Cell concentration (A), cell viability (B), t-PA concentration (C), cell specific productivity (D) in bioreactor cultures.....	56
Figure 4.3 Medium concentration in glutamine (A), lactate (B) and glucose (C) in bioreactor cultures.....	57
Figure 4.4 tPA productivity with time after Na-butyrate addition in bioreactor cultures.... .....	58
Figure 4.5 Specific oxygen uptake rate ( $qO_2$ ) (A) and NAD(P)H fluorescence signal reported per cell (B) in bioreactor cultures. ....	61
Figure 4.6 Intracellular concentration in triphosphate nucleotides with time in bioreactor cultures. ....	64
Figure 4.7 Intracellular concentration in UDP-sugars with time in bioreactor cultures. .	67

Figure 4.8 Percentage in purines (ATP+ADP+AMP+GTP) (open symbols) and pyrimidines (CTP+UTP+UDPGNac) (closed symbols) to the total intracellular cell content in nucleotides with time and extracellular ammonia (grey symbols) in bioreactor cultures.....	69
Figure 4.9 NTP ratio (A) and UTP/ATP ratio (B) with time in bioreactor cultures.....	71
Figure 4.10 Cell t-PA productivity as a function of the cells specific content in ATP in bioreactor cultures, before (closed symbols) and after (open symbols) Na-butyrate treatment.....	73
Figure 5.1 Mesure de fluorescence du NAD(P)H (ex 350/em 450) pour une culture en bioréacteur avec un milieu contenant a) 8,1mg/L de rouge de phénol et b) 0,6mg de rouge de phénol.....	87
Figure 5.2 Mesure de fluorescence du NAD(P)H (ex 350/em 450) pour la culture en bioréacteur a) CTRL b) NaBu-48h et c) NaBu-74h.....	88
Figure 5.3 Mesure de fluorescence (A) de la riboflavine (excitation 450nm/émission 530nm) et (B) du tryptophane/tryptamine (excitation 270nm/émission 370nm) pour les cultures en bioréacteur.....	90
Figure 6.1 Suivi de l'activité du t-PA contenu dans le surnageant de cultures en T-flasks de 75 cm <sup>2</sup> (Moyenne de t-PA actif de deux cultures simultanées) .....	97
Figure 6.2 Suivi de l'activité du t-PA contenu dans le surnageant d'une culture en bioréacteur.....	98
Figure 6.3 Différence de production en t-PA pour des cellules en bioréacteur et en T-flasks .....	100

Figure 6.4 Croissance cellulaire et production de t-PA actif en spinner 250mL (agitation =60RPM).....	102
Figure 6.5 Mesure du t-PA actif contenu dans du surnageant mis en contact avec des disques d'acier inoxydable 0 , 24, 48, 72, 96 ou 144 heures .....	104

**LISTE DES ANNEXES**

Annexe A : Mesure de nucléotides .....	132
Annexe B : Protocole de mesure de glucose .....	137
Annexe C : Protocole de mesure de glutamine .....	139
Annexe D : Protocole de mesure de lactate .....	142
Annexe E : Protocole de mesure de l'ammoniaque .....	144
Annexe F : Protocole de mesure du t-PA actif.....	146
Annexe G : Calcul de $k_{La}$ .....	148
Annexe H : Développement des méthodes d'extraction pour les mesures de HPLC ...	150
Annexe I : Développement des méthodes de mesures de RMN .....	158
Annexe J : Données de débits de gaz, pH et $O_2$ dissous pour les cultures en réacteur .	166
Annexe K : Rendements nutritionnels, énergétiques et de productivité .....	173

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Charge énergétique</b>	$\frac{ATP + 0,5ADP}{ATP + ADP + AMP}$
<b>CHO</b>	Chinese hamster ovary
<b>CTP</b>	Cytidine triphosphate
<b>CTRL</b>	Culture référence en bioréacteur
<b>DPDE</b>	Diphosphodiester
<b>F6P</b>	Fructose-6-phosphate
<b>G6P</b>	Glucose-6-phosphate
<b>GPC</b>	Glycérophosphocholine
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HDAC</b>	Histone déacétylase
<b>HAT</b>	Histone acétyl transférase
<b>MPA</b>	Acide méthylphosphonique (référence externe pour RMN)
<b>NaBu-48h</b>	Culture en bioréacteur avec ajout de Na-butyrate après 48h
<b>NaBu-74h</b>	Culture en bioréacteur avec ajout de Na-butyrate après 74h
<b>NAD</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

<b>B-NADP</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
<b>B-NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
<b>PCA</b>	Acide perchlorique
<b>PCho</b>	Phosphocholine
<b>PCr</b>	Phosphocréatine
<b>PEP</b>	Phosphoenolpyruvate
<b>PETH</b>	Phosphoéthylamine
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>PME</b>	Phosphomonoesters
<b>Ratio NTP</b>	$\frac{ATP + GTP}{CTP + UTP}$
<b>Ratio U</b>	$\frac{UTP}{UDP - GlcNAc + UDPGalNAc}$
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>t<sub>d</sub></b>	Temps de dédoublement
<b>TCA</b>	Acide trichloroacétique
<b>UDP</b>	Uridine 5'pyrophosphate
<b>UDPG</b>	UDP-glucose
<b>UDPGal</b>	UDP-galactose
<b>UDPGalNAc</b>	UDP-N-acetyl-galactosamine
<b>UDPGlcNAc</b>	UDP-N-acetyl-glucosamine
<b>UTP</b>	Uridine 5'triphosphate

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

### 1.1. Problématique

Plus de deux décennies ont passé depuis la production de la première protéine recombinante humaine : l'insuline recombinante Humulin produit par Genentech en 1982 (Walsh 2003). Depuis, l'industrie des biotechnologies n'a cessé son expansion et le marché des protéines recombinantes à lui seul frôlera 53 milliards US\$ en 2010 (Pavlou et Reichert 2004). Le secteur des protéines recombinantes est désormais considéré par l'industrie pharmaceutique pour le traitement de multiples dysfonctions (cardiovasculaire-hémostase, diabète et endocrinologie, maladies infectieuses, oncologie, neuropharmacologique, thérapie enzymatique, cicatrisation, troubles respiratoires) (Pavlou et Reichert 2004). Durant la période 2000-2004, soixante-cinq produits biopharmaceutiques ont été approuvés par l'Union Européenne et/ou les États-Unis. Tous, à l'exception d'un, étaient de nature protéique (Walsh 2005). Au fil des années, des voies d'expression de protéines à valeur thérapeutique via l'élevage d'animaux (chèvres, lapins, etc), l'agriculture ou moléculture et la culture *in vitro* de cellules modifiées génétiquement ont été explorées, la synthèse chimique des protéines n'étant possible que pour de petits peptides.

Des animaux et plantes modifiés génétiquement ont été développés pour la production de protéines humaines récoltées respectivement dans le sang et le lait ou dans la biomasse. De nombreuses problématiques résident toutefois face aux organismes

réglementaires notamment concernant la gestion des grands espaces requis, la grande quantité de biomasse superflue à traiter, l'hétérogénéité de la production (quantité et qualité) associée au cycle de lactation et les longs délais de gestation. Le développement de méthodes de production en bioréacteur par des cellules recombinantes élimine ces contraintes tout en assurant des conditions de culture contrôlées facilitant l'homologation des produits.

Divers systèmes d'expression (bactéries, champignons, levures, cellules d'insectes, de plantes et de mammifères) sont désormais connus pour leur aptitude à produire des protéines recombinantes en bioréacteur, chaque plateforme ayant ses caractéristiques propres. La fonction d'une protéine est reliée à son architecture tridimensionnelle native : la suite d'acides aminés de la structure primaire décide de sa singularité, alors que les hélices  $\alpha$  ou feuillets  $\beta$  de la structure secondaire, les domaines de la structure tertiaire et les modifications post-translationnelles (glycosylation, pont disulfure, etc.) jouent au niveau de la fonctionnalité. Les bactéries sont incapables de faire ces modifications post-translationnelles, alors que les levures ont souvent des patrons de glycosylation incorrects pour le fonctionnement des protéines humaines. Dû à leur machinerie cellulaire développée, les cellules mammifères offrent l'avantage de produire des protéines humaines fonctionnelles.

Malgré des améliorations majeures à la productivité des cultures à grande échelle de cellules mammifères (concentrations obtenues de l'ordre des mg/L-g/L), les coûts de



production des protéines recombinantes demeurent élevés. Une optimisation des procédés est nécessaire, mais le défi réside dans la complexité des systèmes cellulaires et le manque de compréhension des milliers de réactions biochimiques se déroulant au sein des cellules. L'identification d'un état physiologique pour lequel la production est maximale permettrait de développer des systèmes de contrôle ou de cibler des modifications génétiques visant l'atteinte et le maintien de cet état. Or, le choix des paramètres adéquats pour quantifier cet état est critique en raison des nombreuses voies métaboliques et de leur très haut niveau de contrôle de même que des multiples composés participant au fonctionnement de la machinerie cellulaire.

Dans cette optique, les nucléotides, au cœur de plusieurs de ces voies cellulaires, pourrait s'avérer être des indicateurs potentiels de l'état physiologique. Dans le cadre de cultures en suspension de cellules de plantes (Meyer et Wagner 1985) ou de mammifères (Ryll et Wagner 1992), des changements significatifs des concentrations intracellulaires en nucléotides ont notamment été associés aux phases de croissance. Des fluctuations en nucléotides ont de plus été rapportées selon les cycles cellulaires, la prolifération, différenciation et transformation (de Korte, Haverkort, de Boer, van Gennip, et Roos 1987). Pour les cellules modifiées génétiquement, une portion importante de l'énergie cellulaire doit être canalisée vers la production de protéines recombinantes en plus de servir à la synthèse de composés et à la maintenance cellulaire.

## 1.2. Objectifs

Les objectifs de ce projet de maîtrise consistent à étudier l'état physiologique de la cellule et à en évaluer la relation avec son potentiel de production en une protéine recombinante, le t-PA utilisé ici comme protéine modèle.

Pour ce faire, les objectifs spécifiques suivants ont été poursuivis :

- Explorer des outils d'analyse *in vitro* (extraction de nucléotides) et *in vivo* (sondes à fluorescence, RMN) du métabolisme cellulaire;
- Identifier une condition modèle affectant les potentiels cellulaires (productivité, croissance);
- Obtenir des clichés de l'état physiologique des cellules dans le temps par la quantification des métabolites énergétiques intracellulaires avant et après l'imposition d'une perturbation;
- Étudier les liens entre l'état énergétique cellulaire et la productivité en t-PA;
- Identifier des paramètres permettant de suivre les potentiels cellulaires (croissance et production en t-PA).

## 1.3. Structure du mémoire

Le chapitre 2 présente l'état d'avancement du domaine de la production de protéines recombinantes et les raisons ayant motivées ce travail de maîtrise. L'emploi des cellules recombinantes dans les procédés industriels, les caractéristiques des cultures de cellules

mammifères, notamment les conditions de culture, leur métabolisme et les méthodes d'accroissement de la productivité cellulaire y sont abordés. Le chapitre 3 définit la méthodologie de recherche en détaillant les techniques de culture cellulaire, le matériel, les instruments et les méthodes analytiques utilisés au cours de ce travail de recherche. Le chapitre 4 présente l'essentiel des résultats obtenus en un article intitulé « Na-Butyrate Enhances CHO Cells Metabolic State Stability and Recombinant t-PA Productivity » soumis à la revue « Journal of Biotechnology ». Des résultats supplémentaires de suivi de métabolites intracellulaires par sonde à fluorescence à longueurs d'ondes multiples sont présentés au chapitre 5. Le chapitre 6 présente les essais réalisés afin d'étudier l'inactivation du t-PA observée lors des cultures en bioréacteur. Finalement, les deux derniers chapitres font une synthèse du document par une discussion générale au chapitre 7 et les conclusions et recommandations au chapitre 8.

## CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 2.1. Technologie de l'ADN recombinant

Le secteur des biotechnologies, basé sur la production de protéines par les principes de l'ADN recombinant (ADNr), a pris son essor dès le début des années 1970. La première production d'ADNr par Paul Berg en 1972 fut suivie de près par la transformation de *E.coli* par un plasmide recombinant en 1973 par l'équipe de Herbert Boyer. Quelques temps après, ce dernier fonda Genetic Engineering Technology (Genentech), désormais un chef de file dans l'industrie des biotechnologies (Pavlou et Reichert 2004). Peu à peu, les multiples percées dans le domaine des technologies de l'ADNr ont permis le développement de procédés de production à grande échelle de composés actifs thérapeutiques. Bactéries, champignons, levures, plantes entières, tissus, cellules d'insectes, de plantes et de mammifères sont des plateformes étudiées pour leur capacité de production. Or, chaque système d'expression se distingue par ses influences caractéristiques au niveau des produits formés et du procédé de production.

Les systèmes d'expression dans les cellules bactériennes et mammifères sont les plus communs. La vitesse de croissance élevée et le faible coût des milieux de culture des bactéries sont contrebalancés par les limites de leur machinerie cellulaire. Lors de l'insertion d'un gène eucaryote dans des cellules bactériennes, la machinerie des cellules procaryotes peut être inapte à réaliser des repliements adéquats et des modifications post-translationnelles (ponts disulfures, enlèvement de la méthionine en début de chaîne

protéique ou processus de glycosylation et phosphorylation) nécessaires aux fonctions protéiques, telles l'activité, la durée de vie ou la localisation des protéines. Des étapes de renaturation des protéines peuvent alors être nécessaires en fin de procédé, ce qui augmente la complexité et surtout les coûts de production par voie bactérienne (Datar, Carthwright, et Rosen 1993). De plus, le risque de présence de protéines improprement renaturées ou de pyrogènes à potentiel immunogène dans le produit final nuit à son approbation pour une mise en marché. La production de protéines recombinantes dans des cellules mammifères se démarque ainsi par la production de protéines d'origine humaine fonctionnelles, ce qui facilite et diminue les étapes de purification. Le milieu de culture riche peut toutefois favoriser la prolifération de virus, prions et oncogènes. Les cellules d'ovaires d'hamster (CHO) sont les plus utilisées, mais on retrouve également des cellules de myélome de souris (NS0), de rein d'hamster (BHK pour Baby Hamster Kidney), de rein d'embryon humain (HEK-293) et de la rétine humaine.

#### 2.1.1. Activateur du plasminogène humain (Tissue plasminogen activator)

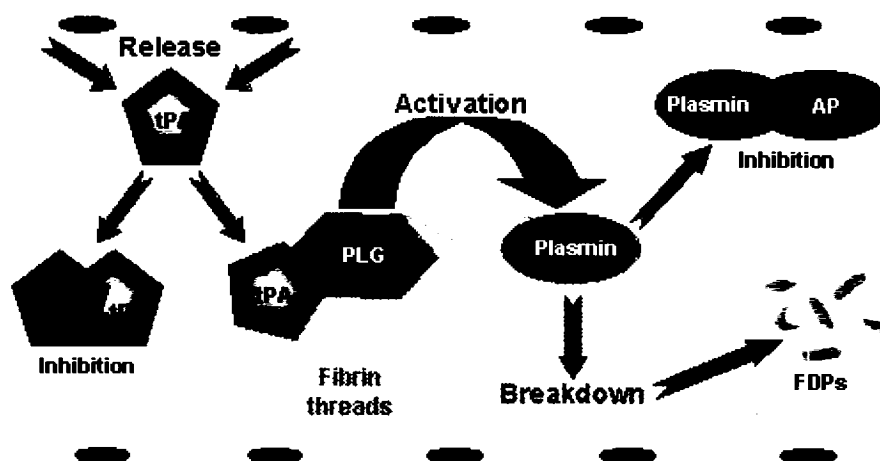
Le premier produit de culture cellulaire à grande échelle mis sur le marché et issu de cellules mammifères plutôt que de bactéries a été le t-PA (activateur du plasminogène tissulaire humain ou tissue plasminogen activator) (Datar, Carthwright, et Rosen 1993). Utilisé dans la fabrication de médicaments pour le traitement des thromboses (revu par Kluft 1988), des doses importantes sont nécessaires en raison de son temps de demi-vie très court dans un environnement biologique (de l'ordre des minutes) résultat de l'élimination rapide par le foie. Pour s'attaquer à ce marché, la compagnie innovatrice

Genentech<sup>®</sup>Inc a reçu l'approbation de la FDA en 1987 pour la mise en marché du médicament Activase<sup>®</sup>, contenant de l'activateur du plasminogène tissulaire humain recombinant (Genentech Inc 2006). Cette section aborde le rôle du t-PA dans le traitement de thrombose et dans la cascade de coagulation sanguine et présente un aperçu de sa structure moléculaire.

La thrombose est caractérisée par la formation d'un caillot (ou thrombus) de fibrine, une protéine insoluble, dans le système de circulation sanguine pouvant causer des infarctus du myocarde, embolies pulmonaires ou accidents vasculaires cérébraux majeurs. Sous des conditions physiologiques normales, le t-PA, une enzyme protéolytique dans la famille des sérines protéases trouvée dans de nombreux tissus, permet la dissolution des caillots vasculaires. Des études tentent de prouver que les patients atteints d'une déficience à produire cette protéine pourraient voir leurs risques à développer des thromboses augmentés (revu par Brandt 2002).

Lors de l'activation de la cascade de coagulation, des molécules d'activateur du plasminogène tissulaire sont sécrétées par les cellules endothéliales et se lient au plasminogène du caillot. Un complexe plasminogène-tPA-fibrine est alors formé ce qui active la conversion du plasminogène en plasmine. La fonction primaire du t-PA est l'hydrolyse d'un lien peptidique spécifique Arg-Val de la molécule de plasminogène. La fibrine agit ainsi à titre d'effecteur de sa propre dégradation tout en assurant une production de plasmine limitée au site de formation des thrombus. Par la suite, le

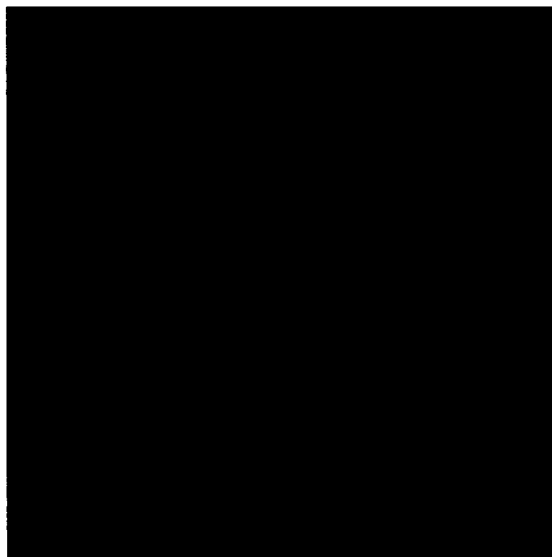
plasmin lyse le fibrinogène et la fibrine constituant le caillot pour former des produits de dégradation solubles. Durant ce processus, la voie fibrinolytique est régulée par des inhibiteurs (antiplasmin et inhibiteur de l'activateur de plasminogène) (Kluft 1988)



**Figure 2.1 Voie fibrinolytique.** Abréviations: tPA: Activateur du plasminogène tissulaire; PAI : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène; PLG : Plasminogène; AP : Antiplasmin; FDPs : Production de la dégradation de la fibrine ou du fibrinogène (French, Blue et Stokol 1997)

L'activateur du plasminogène tissulaire est synthétisé et sécrété sous forme d'une chaîne composée de cinq domaines. Sa séquence primaire est composée de 527 acides aminés, ce qui correspond à un poids moléculaire de 59 008 (en excluant les glucides), soit des glycoprotéines ayant un poids moléculaire entre 60 et 72 kDalton (en incluant les glucides) selon les mesures de SDS-Page. Une molécule de t-PA inclut quatre sites potentiels de N-glycosylation, les résidus 117, 184, 218 et 448. Les cellules CHO produisent deux variantes de t-PA recombinant qui diffèrent au niveau de la glycosylation du résidu Asn-184 et nommées Type I (présence d'un glucide) et type II (absence d'un glucide) (Spellman, Basa, Leonard, Chakel, et O'Connor 1989).

L'activité spécifique du type II est de 30%-50% plus importante que celle du type I (Pohl, Källström, Bergsdorf, Wallén, et Jörnvall 1984). De plus, des études ont montré la présence d'un site sensible à la dégradation protéolytique dans la partie N ou C-terminal de la molécule ce qui explique également que des molécules de poids moléculaires moindres aient été décrites dans la littérature (revu par Kluft 1988).



**Figure 2.2** Activateur du plasminogène tissulaire (The Board of Regents of the University of Wisconsin System 2002)

Lorsque le lien Arg275-Ile276 est clivé, la chaîne simple est convertie en une forme double chaîne, les deux chaînes étant liées par un pont disulfure. La chaîne de faible poids moléculaire contient le site catalytique, probablement formé par les résidus His322, Asp371 et Ser478. La chaîne à haut poids moléculaire est formée de quatre domaines distincts (un « finger domain », une région de facteur de croissance et deux domaines kringle). Une structure de 35 acides aminés précède la protéine mature sur le côté N-terminal et renferme un peptide signal impliqué dans le processus de sécrétion



(revu par Kluft 1988). Tant les molécules sous forme de chaînes simples ou doubles sont actives, bien que la seconde forme tende à avoir une activité accrue sur les substrats synthétiques.

## **2.2. Culture des cellules mammifères**

### **2.2.1 Conditions de culture**

Selon leurs origines et les conditions de culture, les cellules mammifères peuvent être cultivées par croissance sur un support ou en suspension. La mise à l'échelle industrielle de procédés employant des cellules mammifères adhérentes pose de nombreux défis. Les cellules adhérentes ayant besoin d'une surface d'attachement, une maximisation du ratio surface/volume dans les bioréacteurs doit être atteinte pour des densités cellulaires optimales. Ces contraintes ont entraîné le développement de cultures en suspension. Selon les données de la FDA, la majorité des nouveaux produits thérapeutiques produits pour les années 1996 à 2001 par culture de cellules recombinantes provenait de cultures en suspension (Chu et Robinson 2001). Dérivant d'organismes multicellulaires, des conditions de culture bien définies doivent être maintenues pour répondre au métabolisme complexe des cellules animales.

La culture de cellules non adhérentes en suspension requiert un milieu liquide coûteux permettant de supporter la croissance sur plusieurs générations. Alors que tous les premiers milieux utilisés contenaient du sérum bovin, les risques de transmission d'encéphalite spongiforme et d'agents pathogènes contenus dans le sang de même que le

désir d'employer des milieux de composition chimique bien définie ont entraîné le développement de milieu de culture sans sérum. Le milieu est principalement composé de glucose (source de carbone et d'énergie), de glutamine (source d'azote et d'énergie) et autres acides aminés, de sels minéraux, de facteurs de croissance, d'hormones, de lipides et de vitamines. Les conditions de culture sont normalement maintenues à 37°C, avec une concentration en oxygène dissous entre 20 et 50% de la saturation en air et un pH entre 7.1 et 7.6 selon le type de cellules. L'emploi de milieu tamponné selon l'équilibre bicarbonate-CO<sub>2</sub> permet habituellement de contrer l'acidification du milieu au cours de la culture. N'étant pas munies d'une paroi cellulaire rigide, une faible vitesse d'agitation (généralement entre 60RPM et 120RPM), l'ajout d'agent protecteur Pluronic F68 et une aération de surface limitent les dommages aux cellules, plus sensibles que les bactéries au cisaillement et à l'aération.

Les principaux rejets générés par la croissance cellulaire sont le CO<sub>2</sub>, le lactate produit de la glycolyse, et l'ammoniac formé à partir de la glutamine par une dégradation thermique ou par le métabolisme cellulaire. Le gaz ammoniac NH<sub>3</sub> étant très soluble dans l'eau, l'azote ammoniacal existe principalement sous forme de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. (L'ammoniac gazeux en solution dans l'eau est nommé ammoniacque ou ammonium : le terme *ammoniacque* sera désormais utilisé pour exprimer sans distinction les molécules NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et NH<sub>3</sub> en solution). En concentration élevée, le lactate et l'ammoniacque sont des agents inhibiteurs de la croissance et de la productivité. Un contrôle de la consommation en oxygène, en glucose et en acides aminés permet de limiter les rejets en métabolites

inhibiteurs et de contrer les manques en nutriments ce qui favorise la croissance cellulaire. De nombreux travaux de recherche portent d'ailleurs sur l'optimisation des milieux de culture.

### 2.2.2. Mode de cultures

La viabilité d'une culture de cellules mammifères repose en grande part sur les conditions environnementales. Un maintien des valeurs d'humidité, de température et de CO<sub>2</sub> à des niveaux désirés est obtenu par l'emploi d'incubateurs, alors qu'un contrôle plus rigoureux nécessite le recours à des bioréacteurs.

L'incubateur permet le maintien de trois paramètres : alors que l'atmosphère humide vise à limiter les pertes de milieu de culture par évaporation, la température (généralement 37°C) et le CO<sub>2</sub> assurent une croissance adéquate des cellules. L'atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> agit à titre de système tampon régi par une réaction d'équilibre avec le bicarbonate contenu dans le milieu de culture :  $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$ . Des plaques multi-puits, des flacons de type T-flasks ou des flacons en verre avec agitateur (spinners) peuvent être utilisés dans l'incubateur pour les cultures en suspension.

Un contrôle plus complet des paramètres de la culture exige l'emploi d'un bioréacteur muni d'un système informatisé stabilisant l'oxygène dissous et le pH à des valeurs consignes en variant les débits gazeux. Les quatre principaux modes de culture

employés sont les modes cuvée, cuvée semi-alimentée, continu ou perfusion. Les cellules mammifères cultivées en mode cuvée meurent par apoptose, résultat d'une limitation en nutriment ou d'une accumulation en métabolites inhibiteurs. Ainsi, l'alternative d'une culture en mode cuvée semi-alimentée est souvent préférée. Pour contrer les niveaux élevés en rejets métaboliques causés par les fortes concentrations en glucose et glutamine et démontrant l'utilisation inefficace de ces substrats, des travaux de recherche portent sur l'optimisation de l'alimentation des cultures en mode cuvée semi-alimentée pour accroître la croissance et la productivité (Ljunggren et Haeggstroem 1994). Une culture en mode continu est généralement employée pour les études physiologiques et métaboliques puisque qu'elle permet le maintien des cellules dans un environnement mieux contrôlé (Follstad, Balcarcel, Stephanopoulos, et Wang 1999; Nyberg, Balcarcel, Follstad, Stephanopoulos, et Wang 1999). Finalement, les systèmes à perfusion sont utilisés afin d'accroître la productivité volumétrique par une augmentation de la concentration cellulaire atteinte dans le bioréacteur. Ils permettent de surcroît d'améliorer la qualité du produit en diminuant son temps de séjour dans le bioréacteur et en favorisant la viabilité cellulaire. La rétention cellulaire nécessaire pour permettre le renouvellement du milieu de culture peut être réalisée par divers moyens tels la filtration, la sédimentation classique ou la sédimentation acoustique.

Peu importe le mode de culture choisi, une supervision et un contrôle du procédé sont nécessaires au bon déroulement de la culture.

### 2.2.3. Suivi des cultures

La supervision des cultures se fait en suivant l'évolution en ligne ou hors ligne de paramètres sensés refléter l'activité métabolique des cellules. Des sondes de pH, température, oxygène et autres peuvent être ajoutées au système ce qui permet d'obtenir des mesures rapides et non invasives. Les mesures ou estimation de la croissance cellulaire, le principal indicateur de l'état d'une culture, sont plus laborieuses. La littérature suggère donc des méthodes alternatives aux comptes cellulaires par hémocytomètre ou cytomètre de flux pour estimer la densité cellulaire. Ces méthodes sont notamment basées sur des mesures de consommation en oxygène, d'odeur des cultures, de flux de chaleur ou de fluorescence.

Le taux de consommation en oxygène ou OUR est un indicateur de l'état physiologique souvent utilisé comme paramètre de suivi des cultures (Ducommun, Ruffieux, Furter, Marison, et von Stockar 2000; Deshpande et Heinzle 2004). En suivant l'oxygène dissous et le CO<sub>2</sub>, Eyer et Heinzle (1996) ont par exemple étudié la corrélation entre la densité cellulaire et les bilans sur l'ATP (obtenu par le taux de consommation en oxygène et le lactate estimé des mesures de CO<sub>2</sub>). Pour faciliter les mesures précises en oxygène dissous et l'estimation du OUR, plusieurs techniques ont été développées (revu par Ruffieux, von Stockar, et Marison 1998). Le suivi de la production de CO<sub>2</sub> est quant à lui compliqué par l'emploi de milieu tamponné par l'équilibre bicarbonate-CO<sub>2</sub>.

Parmi les nouveaux outils d'analyse, des nez électroniques permettent d'estimer l'activité biologique d'une culture par son odeur. Durant la culture, les gaz émis sont échantillonnés en continu à la sortie du réacteur et soumis à un nez électronique. Le signal généré permet d'établir des corrélations entre les concentrations en métabolites, la viabilité cellulaire, les espèces contaminantes, etc. (Bachinger et Mandenius 2000).

D'autres suggèrent l'estimation des flux spécifiques de chaleur pour définir l'état métabolique d'une culture. Les changements d'enthalpie associés à la croissance cellulaire seraient reliés aux taux de consommation en substrats, de production et de croissance (Guan, Evans, et Kemp 1998).

Finalement, l'emploi d'une sonde à fluorescence a prouvé son utilité pour le suivi dans nos laboratoires de la croissance de cultures de plantes (Hisiger et Jolicoeur 2005b), de *P. pastoris*, de NS0 (Hisiger et Jolicoeur 2005a) et de CHO (résultats en voie d'être soumis). Elle a été démontrée efficace pour suivre les signaux des métabolites tels NAD(P)H, riboflavines et tryptophane/tryptamine des cellules de plantes (Hisiger et Jolicoeur 2005b).

En raison des nombreux composés impliqués dans le métabolisme, le choix de la méthode de suivi la plus représentative de l'état de la culture est difficile. Le suivi des nucléotides, au cœur de plusieurs des réactions cellulaires, pourrait constituer un outil

puissant. Ainsi, des recherches prometteuses visent une meilleure compréhension de l'évolution des cultures cellulaires par une caractérisation de leurs états énergétiques.

#### 2.2.4. Métabolisme énergétique

La génération, le stockage et la disponibilité de l'énergie sont essentiels pour le fonctionnement des systèmes biologiques. Impliquée à tous les niveaux, de la réplication de l'ADN à l'absorption des nutriments et l'élimination des déchets, l'énergie se définit comme la capacité d'effectuer un travail. On en distingue deux principales formes : l'énergie cinétique, soit celle associée au mouvement, et l'énergie potentielle, une énergie de réserve importante pour les systèmes biologiques.

Dans la cellule, l'énergie potentielle se présente fréquemment sous la forme de liaisons entre atomes, de gradients de concentration ou de potentiels électriques. L'énergie étant interconvertible, la rupture de certaines liaisons permet la libération d'énergie chimique qui est à la source de l'énergie potentielle des gradients de concentration et des potentiels électriques. Inversement, l'énergie potentielle stockée dans les gradients de concentration ou les potentiels électriques permet la formation de nouvelles liaisons ou le transport actif de certaines molécules. L'énergie potentielle des cellules est exprimée sous forme de mesure d'énergie libre G.

##### *2.2.4.1. Les molécules énergétiques*

Les cellules mammifères tirent leur énergie des nutriments et l'emmagasinent dans des molécules aptes à mettre en réserve l'énergie libre et à la fournir lorsque requise. La

majorité des voies métaboliques au cœur de la cellule implique de l'ATP et/ou un de ses cofacteurs (NADH et GTP, etc.). Les concentrations en ces molécules caractérisent l'état énergétique de la cellule.

Les dérivés de l'adénosine (une molécule d'adénine liée à un ribose) jouent des rôles majeurs dans les réactions et régulations métaboliques. Découverte en 1929, l'adénosine 5'triphosphate (ATP) est la plus importante molécule capable d'emmagasiner et de fournir de l'énergie libre (Bridger et Henderson 1983). Ce nucléotide est utilisé pour entreposer l'énergie par deux liaisons covalentes phosphoanhydrides hautes en énergie. La rupture d'une liaison dans des conditions standards libère  $7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$  d'énergie libre. Cette énergie libérée de l'hydrolyse de l'ATP est employée pour les réactions métaboliques, telles la synthèse d'acides nucléiques et de protéines, le transport actif et le déplacement. La perte d'un groupe phosphate ou pyrophosphate par l'ATP génère l'adénosine 5'pyrophosphate (ADP), alors que celle de deux groupes produit l'adénosine 5'phosphate (AMP). Ces deux composés peuvent être reconvertis en ATP : la phosphorylation oxydative transforme l'ADP en ATP alors que l'AMP est converti en ADP par l'adénylate kinase.



Autres éléments importants dans le métabolisme cellulaire, on retrouve également :

- **Les dérivés guanosine** : une molécule de guanine liée à un ribose (ex. GTP),
- **Les dérivés de l'uridine** : une molécule d'uracyle liée à un ribose (ex. UTP, UDPG, UDPGal, UDPGlcNAc, UDPGalNAc),
- **Les dérivés cytidine** : une molécule de cytosine liée à un ribose (ex. CTP),
- **Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)** : une coenzyme formée de nicotinamide mononucléotide (NMN) couplée à de l'adénosine monophosphate (AMP) par lien pyrophosphate (ex. NAD, NADH),
- **Le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)** : une coenzyme composée de nicotinamide mononucléotide (NMN) liée par lien pyrophosphate au 5'-phosphate de l'adénosine 2',5'-bisphosphate (ex. NADP, NADPH).

Les principales fonctions de ces composés sont résumées dans le tableau qui suit.

Tableau 2.1 Fonctions des métabolites énergétiques principaux (Atkinson 1977)

Nucléotides	Fonctions
<b>GTP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essentiel à plusieurs réactions métaboliques, notamment la synthèse des protéines (et quelques polysaccharides de la membrane cellulaire)</li> </ul>
<b>UTP, UDP et UDP-hexoses</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Participent à la biosynthèse de polysaccharides ou de composés renfermant des polysaccharides</li> <li>- UTP : précurseur dans la synthèse des UDP-hexoses impliqués dans le métabolisme du glycogène et des glycoprotéines</li> <li>- UDP : porteur pour les hexoses, hexoamines et acides hexuroniques dans la synthèse du glycogène, des glycoprotéines et des glucosaminoglycane</li> <li>- UDP-hexoses : hexose lié à un groupe phosphoryl terminal de l'urine diphosphate (UDP-glucose, UDP-galactose, ...). Agissent à titre d'intermédiaires activés dans la synthèse de polysaccharides, glycosaminoglycane, et glycolipides.</li> <li>- UDP-glucose et UDP-N-acetylglucosamine : parents à partir desquels sont synthétisés les autres UDP-hexoses, hexosamines, et acides hexuroniques.</li> </ul>
<b>CTP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Important dans la synthèse de plusieurs dérivés lipidiques.</li> <li>- Agit à titre de précurseur dans la synthèse des composés comprenant les groupes CDP-, CMP-</li> </ul>
<b>NAD(P)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Impliqué dans de nombreuses réactions enzymatiques à titre de transporteur d'électron en étant en alternance oxydé (<math>\text{NAD}^+/\text{NADP}^+</math>) et réduit (<math>\text{NADH}/\text{NADPH}</math>).</li> </ul>

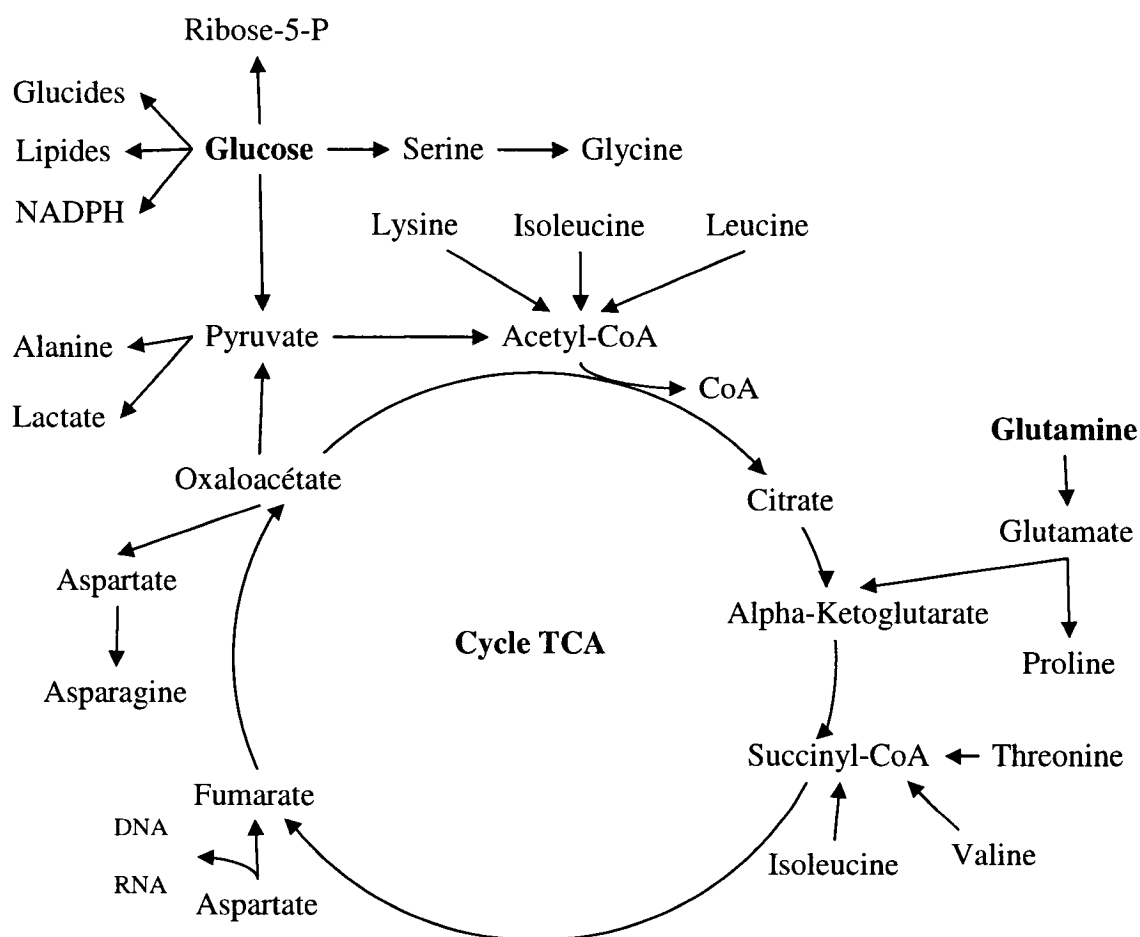
Plusieurs réactions métaboliques étant couplées, les variations de certains ratios de nucléotides spécifiques plutôt que leurs concentrations servent à titre d'indicateur.

Tableau 2.2 Les ratios énergétiques comme indicateur de certaines relations du métabolisme énergétique

Ratio	Rôles/Implication
$\frac{ATP}{ADP}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régulation cinétique (par une influence sur les vitesses de réactions enzymatiques) (Atkinson 1977)</li> <li>- Réactions : respiration et consommation d'énergie (Reich et Sel'kov 1981)</li> </ul>
$\frac{ATP}{AMP}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régulation cinétique (par une influence sur les vitesses de réactions enzymatiques) (Atkinson 1977)</li> </ul>
$\frac{ATP + 0,5ADP}{ATP + ADP + AMP}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indicateur de la régénération des nucléotides adénine (Atkinson 1977)</li> <li>- Charge énergétique</li> </ul>
$\frac{ATP}{GTP}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ratio purines</li> <li>- Maintien par des transferts réversibles de groupements phosphates catalysés par l'enzyme GDP kinase</li> </ul>
$\frac{UTP}{CTP}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ratio pyrimidines</li> </ul>
$\frac{UTP}{ATP}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indicateur de croissance et de synthèse d'ADN (Chou et Rapaport 1984)</li> </ul>
$\frac{ATP + GTP}{UTP + CTP}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indicateur de l'amorce de la phase plateau (Ryll et Wagner 1992)</li> </ul>
$\frac{UTP}{UDPGlcNAc + UDPGlcNAc}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indicateur de production de protéines</li> </ul>
$\frac{NAD^+}{NADH}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réactions : <math>\beta</math>-oxydation et gluconéogénèse (Reich et Sel'kov 1981)</li> </ul>
$\frac{NADP^+}{NADPH}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réactions : Synthèse des acides gras et voie des pentoses phosphate (Reich et Sel'kov 1981; Atkinson 1977)</li> </ul>
$\frac{CoASH}{acetyl - CoA}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réactions : <math>\beta</math>-oxydation et ketogénèse (Reich et Sel'kov 1981)</li> </ul>

#### 2.2.4.2. Réseau réactionnel du métabolisme des cellules animales

Tant le glucose que la glutamine sont utilisés par les cellules mammifères pour fournir l'énergie requise pour la croissance cellulaire ou la synthèse des composés (Lu, Sun, et Zhang 2005). Les molécules énergétiques nécessaires au fonctionnement des cellules sont majoritairement formées par le cycle des acides tricarboxyliques, (abrégé par TCA et aussi appelé cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique (citrate)) et par la chaîne de transport des électrons dans la matrice des mitochondries en aérobose.



**Figure 2.3** Représentation schématique simplifiée du réseau de réactions du métabolisme d'une cellule animale (inspirée d'une figure originale de Xie et Wang 1996b)

La Figure 2.3 schématise le réseau réactionnel du métabolisme des cellules animales (les réactions indiquées sont en réalité une suite de réactions non détaillées). Brièvement, le glucose est transformé lors de la glycolyse en pyruvate pouvant à son tour être converti en plusieurs composés, par exemple le lactate, l'alanine ou l'acétyl-CoA (acétylcoenzyme A). L'acétyl-CoA peut alors entrer et être dégradé dans le cycle TCA : environ 38 molécules d'ATP sont alors produites par molécule de glucose (2 molécules d'ATP de la glycolyse ; 36 molécules d'ATP du cycle TCA et de la chaîne respiratoire) (Cambridge Studies in Biotechnology 1994; Atkinson 1977). La glutamine est quant à elle partiellement oxydée par la glutaminase pour former de l'acide glutamique, qui est par la suite converti en acide  $\alpha$ -ketoglutarique puis dégradé dans le cycle TCA. L'oxydation complète d'une molécule de glutamine dans le cycle de TCA produit 27 molécules d'ATP et deux molécules d'ammoniaque (Lin, Takagi, Qu, Gao, et Yoshida 1999), alors qu'une oxydation incomplète sert à la formation d'acides aminés. Les molécules de glucose et de glutamine peuvent donc être court-circuitées vers d'autres voies métaboliques ce qui réduit la production d'ATP et rend difficile à prévoir la quantité de molécules énergétiques formées par molécules de substrats. Moins de 5% du glucose serait métabolisé via le cycle TCA pour les cultures de cellules animales (Cambridge Studies in Biotechnology 1994), bien que ce pourcentage puisse varier selon la lignée cellulaire et les conditions de culture. La majorité de l'ATP serait produite par le métabolisme du glucose (Xie et Wang 1996a), moins de 30% de l'ATP serait dérivé de la glutamine (Xie et Wang 1996a; Barnabé et Butler 2000). Il est également à noter qu'outre la glutamine, quatre autres acides aminés (aspartate, serine, glutamate et

glycine) ont un apport négligeable dans le métabolisme des nucléotides (Xie et Wang 1996b).

À des niveaux en glucose et en glutamine supérieurs aux concentrations limites, les cellules ont tendance à produire des niveaux élevés de métabolites inhibiteurs, tels le lactate et l'ammoniaque. Toutefois, par le maintien des concentrations en glucose et glutamine près des concentrations limites, une utilisation plus efficace des nutriments peut être observée.

#### *2.2.4.3. État énergétique cellulaire et la productivité*

La fabrication des protéines au sein des cellules est un mécanisme énergivore. Müller et al. (1986) ont estimé à 30% la consommation d'ATP allant à la synthèse protéique, alors que Xie et Wang (1996a) ont évalué à 16% la demande théorique maximale d'ATP pour la production d'anticorps monoclonal. Une part importante des ressources énergétiques des cellules étant allouée à la production, quelques travaux de recherche s'attardent à l'étude de l'état énergétique en lien avec la productivité cellulaire.

Le suivi des métabolites énergétiques en relation avec la productivité pourrait s'avérer un outil puissant pour la caractérisation des états physiologiques et l'optimisation des rendements par une canalisation de l'énergie vers la production. Dans ce sens, les méthodes d'analyse des flux intracellulaires ont permis de corrélérer les taux de production d'ATP à la productivité cellulaire spécifique (Henry 2004). Ainsi, l'augmentation du taux spécifique de production d'ATP pourrait par exemple expliquer l'accroissement du

taux de production d'anticorps observé à des pressions osmotiques élevées (Lin, Takagi, Qu, Gao, et Yoshida 1999). De plus, des chercheurs ont réalisé des essais en employant plusieurs inhibiteurs de la synthèse de l'ADN pour créer un environnement énergétique favorable à la production protéique. Les inhibiteurs ont permis d'augmenter la concentration intracellulaire en ATP et les taux spécifiques de production. En raison des changements de taille des cellules, les auteurs ont toutefois mis en doute l'augmentation réelle par unité de biomasse (Modha, Whiteside et Spier 1992). Également impliqué dans le métabolisme énergétique des cellules, le bassin intracellulaire d'UDP-N-acetylhexosamine (UDP-GNac) a été étudié en relation avec le pourcentage d'anticorps monoclonal (Mab) sécrété par les cellules (Barnabé et Butler 1998).

Alors qu'une forte teneur en métabolites énergétiques favoriserait la production, l'appauvrissement de l'état énergétique cellulaire serait à l'opposé un des mécanismes susceptibles d'expliquer les modifications de la glycosylation des protéines produites selon les conditions de culture. Essentiel pour la production de protéines, le niveau énergétique des cellules serait de plus affecté par les stress cellulaires.

#### *2.2.4.4. État énergétique cellulaire face au stress*

Les études réalisées afin de suivre les nucléotides intracellulaires durant des cultures en suspension ont montré des changements significatifs selon les différentes phases de croissance pour des cellules de plantes (Meyer et Wagner 1985) et de mammifères (Ryll et Wagner 1992). De même, les conditions de culture notamment les concentrations en

glucose, en glutamine, en oxygène dissous, la température ainsi que l'état d'apoptose cellulaire semblent affecter le métabolisme énergétique.

Des changements au métabolisme énergétique ont été observés en fonction des concentrations en sources énergétiques. Des travaux employant une sonde à fluorescence ont montré que des ajouts pulsés en glucose ou en glutamine entraînent une augmentation du signal de NAD(P)H des cellules hybridomes (Siano et Mutharasan 1991). Le glucose en faible concentration exercerait également une influence importante sur le métabolisme énergétique des cellules CHO. Des cultures de CHO avec un milieu contenant une concentration initiale de 5mmol/L en glutamine et au cours desquelles des ajouts pulsés de glucose étaient réalisés ont montré que le niveau d'ATP demeure constant à près de 9,2nmol/10<sup>6</sup>cells pour des concentrations en glucose supérieures à 4,8mmol/L. Toutefois, à des concentrations en glucose de 1,2, 0,54 ou 0,25mmol/L, la concentration en ATP diminuait de 8%, 19% et 47% respectivement (Lu, Sun, et Zhang 2005). Lorsque tout le glucose est consommé, des mesures *in vivo* de RMN-31P ont montré une diminution des signaux d'ATP, suivi de ceux de l'ADP sous les niveaux de détection (Takesada, Ebisawa, Toyosaki, Suzuki, Kawahara, Kojima et al. 2000).

Les changements au métabolisme énergétique ont été observés à des concentrations en glutamine de 0,37mM, la production en ATP baissant lorsque la concentration en glutamine dans l'alimentation est réduite (Mancuso, Sharfstein, Fernandez, Clark, et



Blanch 1998). Barnabé et Butler (2000) ont montré que de faibles concentrations en glutamine (0,5mM) avaient pour effet d'augmenter de façon significative (45-128%) les bassins intracellulaires d'ATP, GTP, CTP, UTP, UDP-GNac et NAD comparativement aux cultures sans glutamine pour des cellules d'hybridomes. Toutefois, les bassins de nucléotides seraient identiques pour des cultures ayant des concentrations en glutamine se situant entre 0,5 et 9mM. D'autre part, il a été montré qu'une concentration en glutamine inférieure à 0,3mM est préférable pour produire un changement significatif dans les flux de glycolyse et de pyruvate déshydrogénase (Mancuso, Sharfstein, Fernandez, Clark, et Blanch 1998).

De plus, par l'estimation des flux intracellulaires, une baisse marquée du taux de production d'ATP a été observée en situation de limitation d'oxygène (Zupke, Sinskey et Stephanopoulos 1995). Les variations métaboliques étant très rapides suite aux changements en oxygène dissous, les techniques de résonance magnétique nucléaire permettent d'obtenir des mesures d'ATP en quelques minutes seulement (Murphy, Gabel, Funk et London 1988).

Les changements de température sont très étudiés pour leur effet stimulant/inhibant sur le métabolisme cellulaire et la productivité. Moore et al. (1997) ont suivi l'effet d'une réduction de température d'incubation de 37°C à 30°C sur des CHO cultivés en bioréacteur. D'après leurs travaux, une réduction de la température de culture à 30°C

n'entraîne pas de modification marquée à la charge énergétique et la teneur en ATP et GTP. Toutefois, en raison de la réduction de la consommation en oxygène suite la baisse de température, ils ont estimé qu'il y avait une réduction de moitié de la production spécifique d'ATP par cellule. D'autre part, l'UTP a montré une chute nette après la baisse de température et les liaisons triphosphates et nucléotides-hexoses ont été décomposées lorsque la viabilité de la culture a diminué (Moore, Mercer, Dutina, Donahue, Bauer, Mather et al. 1997).

Une autre étude a montré que les concentrations totales en nucléotide ne présentent pas de différence significative pour les cultures à 33°C et 37°C, mais une augmentation des concentrations a été notée suite à une hausse à 39°C (Barnabé et Butler 1994). Ils ont observé que le ratio NTP augmente et le ratio U diminue durant les cultures alors que la charge énergétique demeure relativement constante à un niveau supérieur à 0,8 pour chaque culture réalisée à une température d'incubation de 33, 37 ou 39°C. D'autre part, la teneur relative en NAD augmente avec la température d'incubation, alors que la teneur relative en ATP, les ratios  $(ATP + ADP + AMP)/(UTP + UDP-Glc + UDP-GNac)$ , ATP/GTP, purine/pyrimidine et le ratio U diminuent avec un accroissement de la température d'où une possible implication de ces nucléotides dans la régulation du taux de productivité à haute température. De plus, à haute température, la diminution en ATP serait peut-être reliée à l'augmentation observée en NAD qui est synthétisé à partir de l'ATP via NAD pyrophosphorylase. Une diminution de la teneur relative en UTP a

finalement été observée durant chaque culture, possiblement reliée à sa conversion en nucléotides-hexoses (sucre aminé + UTP  $\Rightarrow$  UDP-GNac + Pi) (Barnabé et Butler 1994).

Finalement, en raison de l'implication des mitochondries dans le métabolisme énergétique et de leur sensibilité à l'état physiologique cellulaire, des recherches portent sur l'étude de leur rôle dans l'apoptose. Leur importance a été rapportée dans plusieurs travaux (Green et Reed 1998; Susin, Zamzami, et Kroemer 1998). Davis et Johnson (1999) ont montré que le niveau d'ATP demeure près de celui des cellules de contrôle au cours de l'apoptose de cellules neuronales. Follstad et al. (2000) ont utilisé des spécimens d'une population présentant des variantes dans la physiologie des mitochondries pour identifier des cellules ayant une plus grande résistance à l'apoptose. Ils ont établi qu'une population cellulaire est formée de sous-populations ayant des résistances variées à l'apoptose et que cette hétérogénéité demeure sur plusieurs générations. Les résultats de leur recherche montrent que les cellules présentant un fort potentiel membranaire au niveau des mitochondries démontrent une plus grande résistance à la mort par apoptose.

Agissant sur le métabolisme cellulaire, ces nombreux stress physiologiques sont aussi cités à titre d'agents stimulants/inhibiteurs de la productivité de cellules recombinantes.

### **2.3. Approche permettant l'accroissement de la productivité**

Globalement deux approches peuvent être envisagées pour augmenter le rendement de production de cultures de cellules mammifères en bioréacteur, soit maximiser la densité cellulaire ou la production spécifique (par cellule).

Au cours des 20 dernières années, les avancées dans la composition des milieux de culture chimiquement définis ont haussé significativement les densités cellulaires et la productivité obtenues (par 100 fois dans certains cas). Malgré ces améliorations marquées, les faibles vitesses de croissance des cellules mammifères ( $t_d \sim 10$  à 50h) rendent difficile l'atteinte de hautes concentrations, les cellules de mammifères en réacteur occupant seulement 2-3% du volume total contrairement aux 30% atteints pour les cultures microbiennes. Ainsi, un contrôle plus rigoureux de la composition du milieu en tout temps dans le réacteur est encore de nos jours le sujet de nombreux travaux de recherche. L'optimisation des milieux de culture est notamment réalisée par l'élaboration de milieux sans sérum plus performants ou avec des sources de carbone substitut (Altamiro, Paredes, Illanes, Cairó, et Gòdia 2004). De plus, les formulations des milieux sont habituellement adaptées aux types de procédé de production. Les milieux pour les cultures à l'échelle du laboratoire sont conçus pour une croissance rapide et implique un changement de milieu aux trois jours, alors que ceux utilisés pour les productions industrielles peuvent soutenir les cultures sur une durée d'une à trois semaines (Wurm 2004).

D'autre part, les opportunités d'amélioration de la production reposent également en grande partie sur les lignées. Le raffinement des techniques de préparation des vecteurs de construction, des choix de marqueurs de sélection plus judicieux et des stratégies de sélection plus rigoureuses ont permis d'établir des systèmes d'expression cellulaire davantage performants. En plus de ces techniques d'amélioration génétique, des augmentations de production spécifique ont été observées en jouant sur le métabolisme cellulaire par des variations de température (Moore, Mercer, Dutina, Donahue, Bauer, Mather et al. 1997), de pH (Xie, Pilbrough, Metallo, Zhong, Pikus, Leung et al. 2002), de pression partielle en dioxyde de carbone (Kimura et Miller 1996), de concentration en oxygène dissous (Phillips, Scharer, Bols, et Moo-Young 1987), d'osmolarité (Lin, Takagi, Qu, Gao, et Yoshida 1999) ainsi que du taux de dilution (Follstad, Balcarcel, Stephanopoulos, et Wang 1999). Plusieurs recherches doivent cependant être réalisées afin de déterminer les causes métaboliques expliquant les effets de l'environnement sur la productivité.

Divers agents stimulateurs peuvent également être ajoutés au milieu de culture pour accroître la productivité des cellules, notamment le butyrate de sodium.

### 2.3.1. Effet du butyrate de sodium sur les cellules mammifères

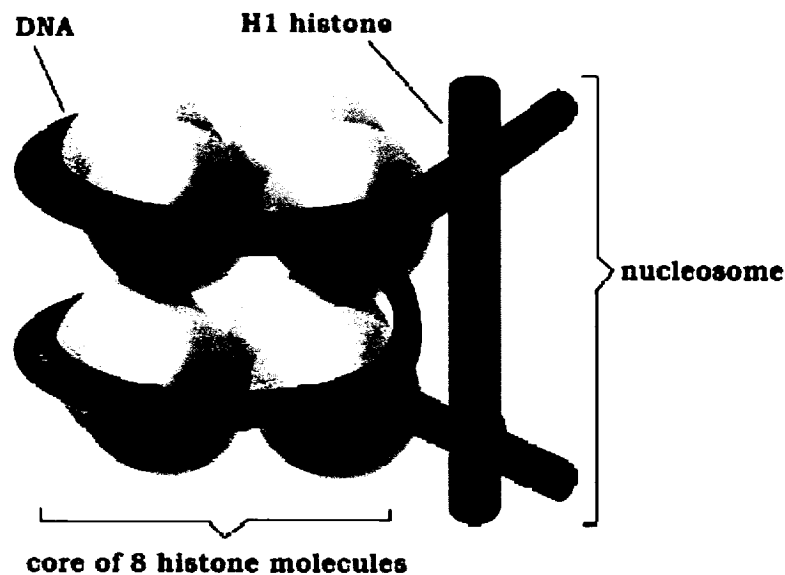
Dans les années 70, plusieurs groupes de recherche ont noté des réponses cellulaires au niveau de la synthèse de l'ADN, de la prolifération et la morphologie et de l'expression de gènes suite à l'ajout de butyrate de sodium (revu par Prasad et Sinha 1976). Dans ces

mêmes années, la découverte par Ingram et ses collègues (1977) de l'interaction du butyrate sur le niveau d'histones acétylés dans des cellules erythroleukémique HeLa et Friend en culture a marqué un point tournant dans la compréhension de son mode d'action (Riggs, Whittaker, Neumann, et Ingram 1977). De nos jours, le butyrate est étudié dans le domaine médical pour ses effets inhibiteur sur le développement de cancers ou stimulateur sur la productivité des cellules recombinantes.

#### *2.3.1.1. Mode d'action*

Le mécanisme d'action du butyrate semble complexe et n'est pas encore totalement résolu. Des travaux ont montré i) que le butyrate est inhibiteur de l'activité de l'enzyme histone déacétylase (HDAC), ii) que des éléments impliqués dans le déclenchement des réponses au butyrate sont présents au sein des promoteurs de nombreux gènes et iii) que le butyrate régule la voie du  $\beta$ -catenin-Tcf (Bordonaro, Mariadason, Aslam, Heerdt, et Augenlicht 1999). Toutefois, les nombreux effets du butyrate sur les cellules laissent supposer une réponse coordonnée complexe.

L'ADN cellulaire est regroupé dans les noyaux sous forme de chromatine, une macromolécule dynamique complexe composée d'unités répétées nommées nucléosomes. Chaque cœur nucléosomal est formé d'un fragment d'ADN (146bp) enveloppant 8 molécules d'histone (soit 4 histones partenaires, un tétramère H3-H4 et deux dimères H2A-H2B) (Luger, Mäder, Richmond, Sargent, et Richmond 1997).



**Figure 2.4 Nucléosome (Monneret 2005)**

Les histones sont des petites protéines riches en acides aminés lysine et arginine. Les histones nucléosomiques comprennent deux domaines : le domaine C-terminal situé dans le centre du cœur nucléosomal et le domaine N-terminal avec des résidus lysine s'étendant hors du nucléosome et pouvant subir des modifications post-translacionnelles telles des acétylations, phosphorylations et méthylations. L'acétylation des histones résulte d'un équilibre dynamique entre l'action des enzymes compétitrices histone déacétylase (HDAC) et histone acétyl transférase (HTA). Alors que l'acétylation résulte en l'activation de la transcription, la déacétylation des histones induit une répression de la transcription par condensation de la chromatine. L'acétylation cause la neutralisation de la charge positive du résidu lysine dans la queue N-terminal ce qui relâche le contact histone-ADN (revu par Monneret 2005). Il a été démontré que le traitement des cellules

avec du butyrate entraîne une hyperacétylation des histones par une inhibition de l'activité de l'histone déacétylase (Candido, Reeves, et Davie 1978; Boffa, Vidali, Mann, et Allfrey 1978; Sealy et Chalkley 1978). Son mode d'action est méconnu et des travaux ont montré que le butyrate est un inhibiteur non compétitif de l'HDAC ce qui sous-entend que le butyrate ne s'associe pas au site de liaison du substrat (Cousens, Gallwitz, et Alberts 1979).

Les modifications post-translationnelles des histones au cœur des chromatines font parties des mécanismes importants impliqués dans la régulation des gènes. Des changements dans les niveaux d'acétylation des histones se produisent lors de nombreux processus nucléaires tels la réplication, le « transcriptional silencing » et l'activation. Toutefois, l'inhibition de l'activité de l'HDAC semble affecter un nombre limité de gènes, modifiant l'expression de seulement 2% des gènes mammifères (Van Lint, Emiliani, et Verdin 1996). Des éléments impliqués dans les réponses au butyrate peuvent être trouvés dans les promoteurs des gènes affectés par la présence de butyrate, ces gènes pouvant être divisés en deux groupes (revu par Davie 2003). Le premier regroupe des gènes possédant une séquence commune d'ADN au sein de leur promoteur qui cause l'induction ou la répression du gène et qui suggère la liaison d'un facteur commun de transcription à ce site. Un autre groupe de gènes partage un site de liaison Sp1/Sp3 dans leur promoteur qui agit sur l'induction de leur productivité, Sp1 et Sp3 étant des facteurs de transcription mammifères qui agissent à titre d'activateur ou de répresseur.



Ces mécanismes d'inhibition de la synthèse d'ADN par ajout de composés chimiques sont suggérés d'induire un environnement favorable à la production d'anticorps en libérant plus d'ATP pour la synthèse cellulaire.

#### *2.3.1.2. Emploi pour la production de protéines recombinantes*

Pour ses effets stimulateurs sur la productivité, le butyrate de sodium est étudié dans le cadre des travaux sur les cellules recombinantes.

L'ajout de butyrate de sodium induit des effets d'induction ou de répression à l'expression des gènes, mais cause également l'inhibition de la croissance cellulaire. Plusieurs travaux ont montré l'effet stimulant de l'ajout de butyrate de sodium sur la productivité de cellules mammifères dont les CHO (Hunt, Batard, Jordan, et Wurm 2002), pour diverses protéines telles le Factor VIII et le t-PA (Palermo, DeGraaf, Marotti, Rehberg, et Post 1991; Hendrick, Winnepenninckx, Adelkafi, Vandeputte, Cherlet, Marique et al. 2001). En contrepartie à son effet stimulant, le butyrate de sodium inhibe la croissance cellulaire et conduit même à l'apoptose. En présence de butyrate, les cellules en culture sont bloquées dans la phase  $G_0$ - $G_1$  (Cherlet et Marc 2000; Hendrick, Winnepenninckx, Adelkafi, Vandeputte, Cherlet, Marique et al. 2001). L'apoptose des cultures cellulaires avec ajout de butyrate de sodium est contrée ou limitée par la surexpression de la protéine Bcl-2, une protéine antiapoptotique (Yun et Gyun 2005).

## **CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE**

Le matériel et les méthodes décrits dans ce chapitre complètent ce qui est présenté aux chapitres résultats qui suivent.

### **3.1. Culture cellulaire**

#### **3.1.1. Lignées cellulaires**

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovaries) transfectées par un plasmide codant pour l'activateur du plasminogène tissulaire humain ou t-PA (ATCC, Cat.No. CRL9606) ont été adaptées à la culture en suspension par le laboratoire de M.Butler, professeur à l'Université du Manitoba et partenaire dans le groupe de recherche CellNet.

#### **3.1.2. Passage et essais préliminaires**

Le passage routinier des cellules a été réalisé à tous les quatre jours avec une concentration à l'inoculation de  $1,0 \times 10^5$  cellules/mL. Les cellules ont été cultivées dans des T-flasks 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> ou 150cm<sup>2</sup> (Fisher Scientific Ltd, Ontario, Canada) contenant respectivement 5mL, 25mL ou 60mL de milieu de culture sans sérum Biogro-CHO, special CellNet formulation (Biogro Technologies Inc., Manitoba, Canada) avec 0,2% de Pluronic F68 et 8,1mg/L de rouge de phénol. Les T-flasks ont été placés dans un incubateur à T=37°C, 10%CO<sub>2</sub>, 100% H.R. Les tests préliminaires ont été faits en T-flasks de 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> ou 150cm<sup>2</sup> ou en spinner de verre de 250mL (surface siliconée par Sigmacote® : Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada)

### 3.1.3. Bioréacteur

#### 3.1.3.1. Système

Les cultures en bioréacteur ont été réalisées dans un bioréacteur Chemap (ChemapAG, Suisse) de 3.5L (Volume utile = 2,7L) muni de sondes à oxygène dissous, pH et fluorescence. Les cultures se sont déroulées sur sept à dix jours à une température de 37°C et ont été agitées par un double ruban hélicoïdal à 60RPM ( $k_{La} = 1,04h^{-1}$ ). Le niveau d'oxygène dissous a été contrôlé à un minimum de 50% de la saturation en air par des alimentations en air et en oxygène alors que le pH a été stabilisé entre 7-7.4 par une alimentation en CO<sub>2</sub>. Les gaz ont été alimentés dans l'espace libre en tête de cuve et les débits ont été contrôlés par des débitmètres (mass-flows). Le bioréacteur a été passivé lorsque nécessaire (au signe de lixiviation des métaux de la cuve).

#### 3.1.3.2. Inoculum

Afin de limiter les effets de stress sur l'inoculum, la même démarche de préparation de l'inoculum a toujours été suivie, car il a été montré pour des cultures en continu que le régime permanent spécifique atteint dépend du trajet opératoire suivi pour atteindre ce régime permanent (Follstad, Balcarcel, Stephanopoulos, et Wang 1999). Les cellules, provenant d'une même banque, ont été amplifiées par des cultures successives en T-flasks. L'étape finale d'amplification de l'inoculum (cellules au passage 6) a été réalisée dans des T-flasks placés dans l'incubateur à T=37°C, 10%CO<sub>2</sub>, 100% H.R. Au jour 4, une quantité de cellules suffisantes pour permettre l'inoculation du bioréacteur avec  $1.0 \times 10^5$  cellules/mL a été centrifugée (1050RPM, 5min) et remise en suspension dans du

milieu de culture sans sérum Biogro-CHO, special CellNet formulation (Biogro Technologies Inc., Manitoba, Canada), contenant 0,2% pluronic F-68 et une concentration réduite de 0,6mg/L rouge de phénol.

#### *3.1.3.3. Échantillonnage*

Les échantillons ont été prélevés quotidiennement. Le volume de suspension prélevé a été déterminé afin d'obtenir à chaque fois trois culots cellulaires d'environ  $3 \times 10^6$  cellules afin d'en extraire les nucléotides. Du surnageant a été stocké dans l'azote liquide pour les analyses subséquentes.

### **3.2. Réactifs**

#### **3.2.1. Standards de nucléotides**

Des solutions standards ont été préparées pour les mesures de nucléotides par HPLC-MS pour les composés : ATP, ADP, AMP, UDPG, UDPGal, GTP, CTP, UTP, NAD, NADP, UDPGalNAc et UDPGlcNAc (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada). Les calculs pour la préparation des solutions sont présentés en Annexe.

#### **3.2.2. Autres**

La préparation des solutions de butyrate de sodium est détaillée dans le manuscrit de l'article.

### 3.3. Méthode analytique

#### 3.3.1. Extraction des nucléotides

La méthode d'extraction employée est similaire à celle développée par Ryll et Wagner (1991). Les composés intracellulaires des culots cellulaires, maintenus sur la glace, ont été extraits en présence de 500µL d'acide perchlorique 0,5M. Les suspensions ont été homogénéisées par aspirations/refoulements durant une minute avant d'être conservées sur la glace durant 2 minutes. Les suspensions ont alors été centrifugées à 4°C et 10 000g pour 3 minutes. Les surnageants ont été récupérés et les culots cellulaires ont été extraits une seconde fois en présence de 500µL d'acide perchlorique 0,5M. Les culots cellulaires ont été mis en suspension par aspirations/refoulements, puis maintenus sur la glace 2 minutes. Les suspensions ont alors été centrifugées à 4°C et 10 000g pour 3 minutes et les surnageants ont été récupérés et joints à ceux de la première extraction. Les surnageants ont été neutralisés avec 0,30mL de  $\text{KHCO}_3$  2M. En raison d'un précipité de perchlorate de potassium formé lors de la réaction de neutralisation, les suspensions ont alors été centrifugées de nouveau à 4°C et 15 000g pour 3 minutes. Les extraits ont été stockés dans l'azote liquide en attente des analyses.

#### 3.3.2. Mesure des nucléotides par HPLC-MS

Les extraits dégelés et maintenus sur la glace ont été clarifiés à l'aide de filtres en nitrocellulose de 0,22 microns (Millipore Canada, Ontario, Canada). Puis, les nucléotides ont été quantifiés à l'aide d'un HPLC suivi d'un spectromètre de masse

(Waters limited, Québec, Canada). Une colonne Symmetry C18 (Waters limited, Québec, Canada) a été employée en chromatographie phase inverse avec appariement d'ions pour toutes les mesures. Les analyses ont été effectuées par Steve Hisiger, associé de recherche.

### 3.3.3. Mesure de fluorescence

Les mesures *in situ* de fluorescence ont été effectuées à l'aide d'une sonde à fluorescence à longueurs d'ondes multiples (Delta Light and Optics, Lyngby, Denmark). La sonde se compose d'une unité centrale qui contient une lampe de Xe comme source lumineuse de même qu'une sonde pouvant être insérée dans un port latéral standard d'une longueur de 70 mm et d'un diamètre de 25mm. Elle est liée à l'unité centrale par deux canaux optiques, un pour conduire la lumière d'excitation et l'autre pour renvoyer le signal d'émission. Deux carrousels de filtres indépendants contenant 15 filtres chacun avec une largeur de bande de 20 nm ont été utilisés afin de pouvoir choisir la longueur d'onde d'excitation et celle d'émission. Le signal d'émission est reçu et amplifié par un photomultiplicateur à gain ajustable. Un spectre à deux dimensions peut être récolté pour des longueurs d'onde allant de 270 à 550 nm pour l'émission et de 310 à 590 nm pour l'excitation dans un délai d'une minute. L'acquisition a été effectuée avec un gain de 1300 (sur un maximum de 4095) pour chaque mesure.

#### 3.3.4. Compte cellulaire et viabilité

À chaque passage, un compte cellulaire et un estimé de la viabilité ont été effectués à l'aide d'un hémocytomètre et d'une coloration des cellules au bleu de trypan (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada).

#### 3.3.5. Mesure de la concentration en glucose extracellulaire

Le glucose contenu dans le milieu de culture est converti en glucose-6-phosphate par l'enzyme hexokinase contenue dans le réactif (Glucose reagent, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada). Le glucose-6-P est ensuite oxydé en 6-phosphogluconate par l'enzyme glucose-6-P deshydrogénase également contenue dans le réactif. Cette oxydation provoque la formation de NADH dont la concentration est proportionnelle à la quantité de glucose initiale. La concentration en NADH est mesurée par absorbance à 340 nm. Les concentrations en glucose dans les échantillons doivent se situer entre 0,03mmol/L (0,006g/L) et 33,31mmol/L (6g/L)

#### 3.3.6. Mesure de la concentration en glutamine extracellulaire

La quantification de la glutamine est fondée sur un test colorimétrique formulé spécifiquement pour la culture cellulaire (Glutamine assay kit; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada). Le test est basé sur la déamination réductive de la L-glutamine par un enzyme. La quantification est obtenue en associant une teinte à la réaction de réduction dont la coloration est mesurée par absorbance à 550 nm. Les concentrations en glutamine dans les échantillons doivent se situer entre 0,25mmol/L et 6,0mmol/L.

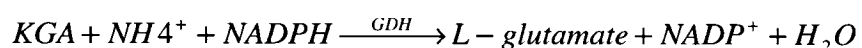
Cette réaction est spécifique à la L-glutamine et n'entraîne pas de réaction secondaire avec d'autres acides aminés ou l'ammoniaque.

### 3.3.7. Mesure de la concentration en lactate extracellulaire

La quantification du lactate repose sur un test enzymatique formulé pour des analyses sanguines (Lactate reagent ; Trinity Biotech, Co Wicklow, Ireland). Le test est basé sur la transformation de l'acide lactique en pyruvate et en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la lactate oxydase. En présence du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé, la peroxydase catalyse l'oxydation du précurseur chromogène pour produire une coloration ayant son maximum d'absorption à 540nm. L'augmentation d'absorbance à 540nm est directement proportionnelle à la concentration de lactate dans l'échantillon.

### 3.3.8. Mesure de la concentration en ammoniaque extracellulaire

Le test de quantification de l'ammoniaque (Ammonia Assay Kit; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada) est basé sur la réaction de l'ammonium avec l'acide  $\alpha$ -ketoglutarique (KGA) et la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) en présence de L-glutamate déhydrogénase (GDH) pour former L-glutamate et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé (NADP<sup>+</sup>).



La diminution d'absorbance à 340nm, due à l'oxydation du NADPH, est proportionnelle à la concentration en ammonium (et en ammoniaque). Les données sont obtenues en concentration d'ammoniaque.

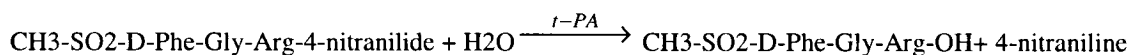


### 3.3.9. Mesures des anions et des cations extracellulaires

Les ions extracellulaires contenus dans le surnageant ont été mesurés par HPLC par Jingkui Chen, associé de recherche. Les anions extracellulaires  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  et cations  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ont été quantifiés à l'aide de courbes standards.

### 3.3.10. Mesure de la concentration en t-PA actif

Les analyses enzymatiques de détection du t-PA actif ont été effectuées en employant le substrat Chromozym t-PA (Roche Diagnostics, Québec, Canada). Le protocole suivi a été modifié par le laboratoire de Jeno Scharer de l'Université de Waterloo (Gheshlaghi, Guo et Scharer). Le principe de base de cette analyse repose sur l'action du t-PA qui clive une molécule de chromozym pour former du 4-nitraniline. Ce composé peut être mesuré à 405nm. La réaction est illustrée par l'expression suivante :



Pour chaque série de mesure, une courbe étalon a été préparée à l'aide de t-PA humain (activité spécifique du lot de 630KU/mg protéine; EMD Biosciences, Inc, Californie, USA).

## **CHAPITRE 4 : ÉTUDE DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE À TITRE D'INDICATEUR DE LA PRODUCTIVITÉ DES CELLULES CHO PAR DES AJOUTS DE BUTYRATE DE SODIUM**

### **4.1. Présentation de l'article**

Le manuscrit de l'article intitulé « Na-Butyrate Enhances CHO Cells Metabolic State Stability and Recombinant t-PA Productivity » a été soumis à la revue *Journal of Biotechnology*. Dans ce manuscrit, les résultats du suivi du métabolisme énergétique durant trois cultures en bioréacteur sont présentés. Les croissances cellulaires et variations en nucléotides et en production de t-PA ont été comparées pour des cultures avec ou sans ajout de butyrate de sodium. Le rôle du métabolisme énergétique dans la productivité cellulaire est discuté.

### **4.2. Na-Butyrate Enhances CHO Cells Metabolic State Stability and Recombinant t-PA Productivity**

#### **4.2.1. Abstract**

This work aims at characterizing the effect of Na-butyrate on CHO cells physiological behavior and productivity of recombinant t-PA. Three batch cultures were performed in a 3.5-L bioreactor without Na-butyrate or with Na-butyrate addition at mid-exponential growth phase (48 h) or at the end of exponential growth phase (74 h). Both cultures with Na-butyrate showed higher specific productivity in t-PA and lower final cell density. Maximum t-PA productivity for all cultures coincided at ~84 h, the early plateau growth

phase. The cells specific oxygen uptake rate ( $qO_2$ ) increased immediately after the Na-butyrate addition and was maintained higher than that of the control culture. Triphosphate nucleotides, ADP, AMP and UDP-sugars have all increased from 84 h for both cultures with Na-butyrate, showing different behaviors for Na-butyrate addition at 48 h and 74 h. However, Na-butyrate did not affect the cells energy charge until cell viability decreased (156-168 h). Purines and nucleotides ratios such as  $(ATP+GTP)/(UTP+CTP)$  and  $UTP/ATP$  showed similar trends for the control and the culture with Na-butyrate addition at 74 h with clear shifts in behavior at 84 h and 168 h. However, addition of Na-butyrate at 48 h showed to damp the observed variations in the cells purines and nucleotides ratios as compared to both the control culture and the culture with Na-butyrate addition at 74 h. Finally, t-PA productivity showed to be related to the cells intracellular ATP concentration and to cells viability.

---

**Keywords:** CHO cells, Na-butyrate, t-PA production, energy state, nucleotides

---

#### 4.2.2. Introduction

Mammalian cell culture is well established as an industrial production platform for recombinant proteins (Walsh 2005). However, our capacity of controlling bioprocess stability and reproducibility is still highly limited. Different strategies have been investigated in order to improve the cells robustness and yield in proteins. One of the proposed strategies which showed to be efficient consists of reducing cells growth at the production phase. Switching to serum-free medium, Yuk et al. (2002) showed adherent CHO cells to arrest growth and then continuously produce recombinant  $\gamma$ -Interferon for

multiple passages. Bollati-Fogolín et al. (2005) showed that CHO cells productivity in recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor (CHO-K1-hGM-CSF) was enhanced when the cells were cultivated at 33 °C as compared to 37 °C, while the growth rate was significantly reduced. Diverse chemicals, metabolites and intermediates have been assayed to induce a growth rate reduction while enhancing recombinant protein production, and sodium butyrate (also called butyrate) has shown to be efficient for animal cells: CHO cells (Hunt et al. 2002); human endothelial cells (Kooistra et al. 1987) and hybridoma (Cherlet and Marc 2000). Na-butyrate showed to stimulate CHO cells production of Factor VIII and other heterologous secreted proteins (Dorner et al. 1989), green and yellow fluorescent proteins (GFP, YFP) (Hunt et al. 2002) and t-PA (trans-plaminogen activator) (Palermo et al. 1991; Hendrick et al. 2001; Kooistra et al. 1987). Although the exact mechanism of action of Na-butyrate is unknown, it affects the chromatin structure and modifies gene expression. Na-butyrate could induce hyperacetylation of the histones by inhibiting histone deacetylase (HDAC) activity (Riggs et al. 1977; Sealy and Chalkley 1978; Boffa et al. 1978; Candido et al. 1978) in a non-competitive way (Cousens et al. 1979), induce or repress gene promoter expression (reviewed by Davie 2003) and/or affect  $\beta$ -catenin-Tcf signalling (Bordonaro et al. 1999). It stimulates protein production through its positive effect on mRNA levels (Kooistra et al. 1987). However, it also has a cytotoxic effect, thereby inducing growth inhibitory effect even leading to apoptosis. The efficiency of Na-butyrate has thus been reported but, surprisingly, little is known on the cell metabolic and physiological changes in behavior.

This work thus aims at characterizing the effect of Na-butyrate on t-PA producing CHO cells metabolism, physiology and productivity, focusing on intracellular nucleotides and nucleosides playing a central role in cells energy metabolism and in the regulation of cellular processes. Nucleotide pools are known to be affected by the addition of diverse compounds in the cells environment, such as AMP (Weisman et al. 1988), ethanol, fructose and nicotinamide (Williams et al. 1987), DMSO (de Korte et al. 1987), serum (Grummt et al. 1977) and colchicine (Chou and Rapaport 1984). T-flask cultures were first performed to determine Na-butyrate concentration which causes an increase in t-PA productivity while moderately affecting cell viability. Then, 3.5-L bioreactor batch cultures were performed with or without Na-butyrate addition, and intracellular nucleotides were measured from cell extracts. Effect of adding Na-butyrate in the mid-exponential growth phase (48 h) and at the end of the exponential phase (72-74 h) was studied. Cultures were compared from nucleotides and nucleosides concentrations and ratios and from the cells energy state with time.

#### 4.2.3. Experimental

##### *4.2.3.1. Cell line and culture medium*

t-PA producing CHO cells (Chinese Hamster Ovaries) (ATCC, CRL9606) adapted to serum-free suspension culture were obtained from Dr. Butler, University of Manitoba. Biogro-CHO serum-free medium, special formulation (Biogro Technologies Inc., Manitoba, Canada) was supplemented with 0.6 mg L<sup>-1</sup> phenol red (Cat.No.P5530, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada) and 0.2 % Pluronic F68 (Cat.No.P1300,

Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada). Phenol red concentration was increased to  $8.1 \text{ mg L}^{-1}$  for T-flask cultures. All cultures were inoculated at a cell density of  $1.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ . A master cell bank was first generated and cells (aliquots) from this stock were thawed and cultured in T-flasks for six passages. Four-day-old cells from the sixth passage were counted and the volume needed as inoculum was centrifuged and cells were resuspended in fresh medium.

#### *4.2.3.2. T-flask cultures*

Experiments were performed in  $75 \text{ cm}^2$  T-flasks (Fisher Scientific Ltd, Ontario, Canada) in 25 mL Biogro-CHO serum-free media. Four-day old cells were inoculated in fresh media with a concentration of  $1.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ . The T-flasks were incubated at  $37^\circ\text{C}$ , 10 % $\text{CO}_2$  and 100 %H.R. A solution of 240 mM butyric acid sodium (Cat.No.B5887, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada) was added 48 or 72 hours post-inoculation, injecting required volumes to obtain respective final concentrations in the culture of 1, 3 or 5 mM Na-butyrate. Two T-flasks were also used as control cultures. Samples were taken daily for cell count and viability determination and the supernatant was kept at  $-20^\circ\text{C}$  for subsequent t-PA analysis.

#### *4.2.3.3. Bioreactor cultures*

Bioreactor cultures were performed in a 3.5-L stirred tank jacketed bioreactor (ChemapAG, Switzerland) with a working volume of 2.7 L. Agitation speed was maintained at 60 RPM by a double helical ribbon impeller having the same geometrical ratios as Jolicoeur et al. (1992). Temperature was maintained at  $37^\circ\text{C}$ . Dissolved oxygen

measurement was performed by a polarographic probe (Cat.No.InPro 6800, Mettler Toledo, Mississauga, Ontario, Canada) connected to a data acquisition and control system (Virgo, Longueuil, Quebec, Canada). The dissolved oxygen concentration was controlled at 50 % of air saturation by continuous feed of an air/oxygen/CO<sub>2</sub> mixture in the headspace. Medium pH was maintained at  $7.2 \pm 0.2$  from a gas feed containing 0-10 %CO<sub>2</sub>. One culture consisted in a control. A second culture experienced Na-butyrate addition 48 hours post-inoculation (*NaBu-48h*): 16 mL of a solution of 130 mM Na-butyrate (Cat.No.B5887, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada) was added for a final concentration of 1 mM Na-butyrate. A third culture received an addition of Na-butyrate in the mid exponential phase 74 hours post-inoculation (*NaBu-74h*): 22 mL of a solution of 90 mM Na-butyrate was added for a final concentration of 1 mM Na-butyrate. Samples (volume varying from 260 mL to 4 mL to obtain  $9.0 \times 10^6$  cells each time) were taken twice a day and supernatants were frozen in liquid nitrogen for later analysis.

#### 4.2.3.4. Assays

Cells were counted (three to four times per sample) using a haemocytometer and viability determination was performed by the trypan blue exclusion method. Glucose, glutamine, ammonia and lactate concentrations in the broth were measured using enzymatic assays (Glucose assay reagent Cat.No.G-3293, Glutamine assay kit Cat.No.GLN-2, Ammonia Assay Kit Cat.No.AA0100: Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada; Lactate reagent: Cat.No.735-10, Trinity Biotech, Co Wicklow, Ireland). t-PA concentration was also measured by an enzymatic assay (Chromozym t-

PA Cat.No11 093 037 001: Roche Diagnostics, Quebec, Canada) using t-PA standard with a specific activity of 630KU mg<sup>-1</sup> protein (Cat.No.612200, EMD Biosciences, Calbiochem brand, California, USA), following a protocol adapted for 96 wells plates by the group of Dr. Scharer, University of Waterloo. t-PA production rate was estimated by centered difference or by the slope of the concentration of active t-PA versus the integral under the growth curve as suggested by Renard et al. (1988) to measure antibody production rate.

#### *4.2.3.5. Specific Oxygen Uptake Rate*

The specific oxygen uptake rate was estimated from a mass balance on oxygen using gas flow rates and dissolved oxygen on-line measurements as described by Siano and Mutharasan (1991). A  $k_La$  value of 1.04 h<sup>-1</sup> was determined in triplicate with water by the gassing (air) method. Degassing was performed using N<sub>2</sub> gas fed at the same flow rate as air.

#### *4.2.3.6. Analysis of Nucleotides*

The extraction process used was based on the method developed by Ryll and Wagner (1991). Briefly, 3.0x10<sup>6</sup> cells were harvested by centrifugation at 200 g for 3 min at 4 °C. Cell pellets kept on ice were extracted twice, using each time 500 µL of 0.5 M perchloric acid. Between each extraction the pellet was centrifuged at 10 000 g for 3 min at 4 °C. Extracts were neutralized by the addition of 300 µL 2 M KHCO<sub>3</sub>. The precipitate formed from the neutralization reaction was removed by a centrifugation at 15 000 g for 3 min at 4 °C. Extracts were stored in liquid nitrogen prior to analysis.



Then, extracts were filtered (0.2  $\mu\text{m}$  filters, Cat.No.GSWP01300 , Millipore Canada, Ontario, Canada) and used for quantification by HPLC-MS (Micromass ZQ, Waters, Milford, MA, USA). Nucleotides were separated on a Symmetry  $\text{C}_{18}$  column (150\*2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a Symmetry  $\text{C}_{18}$  guard-column (Waters). *N,N*-Dimethylhexylamine (DMHA) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada) was used as ion-pairing agent. Mobile phase consists in Buffer A: 25 mM Ammonium acetate, 30 mM DMHA, pH 7.00 and Buffer B: 40 % (v/v) Acetonitrile in water. Flow rate was set at 0.3 mL min<sup>-1</sup> using the following gradient: 0-5min 7.5 %B, 5.5-47 min linear gradient from 12 %B to 65 %B then 48-56 min 100 %B. Detection was performed using a single quadrupole mass spectrometer under positive electrospray conditions. Quantification was performed in single ion recording (SIR) mode, based on the detection of the  $[\text{M}+\text{DMHA}+\text{H}]^+$  ion for each compound. Electrospray conditions were: capillary voltage = 3.2 kV, cone voltage = 25 V, source temperature = 120 °C, desolvation temperature = 350 °C.

Quantification was done by integrating peak areas using calibration curves for ATP, ADP, AMP, UDPG+UDPGal, GTP, CTP, UTP and UDPGalNAc+UDPGlcNAc (all from Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada). The extraction method was validated by spiking samples and gave recovery yields higher than 71 %. For bioreactor cultures, extractions were performed in triplicate for each sample. The three extracts were analyzed separately as three distinct HPLC-MS analysis and the mean values were calculated and shown in the figures of the Results and Discussion section. The mean

relative standard error resulting from cell extraction and the HPLC-MS measurement was less than 25 %.

#### *4.2.3.7. Multiwavelength fluorescence measurements*

*In situ* fluorescence measurements of NAD(P)H, the sum of NADH and NADPH, were performed using a multiwavelength fluorescence probe (Delta Light and Optics, Lyngby, Denmark), as previously described by Hisiger and Jolicoeur (2005).

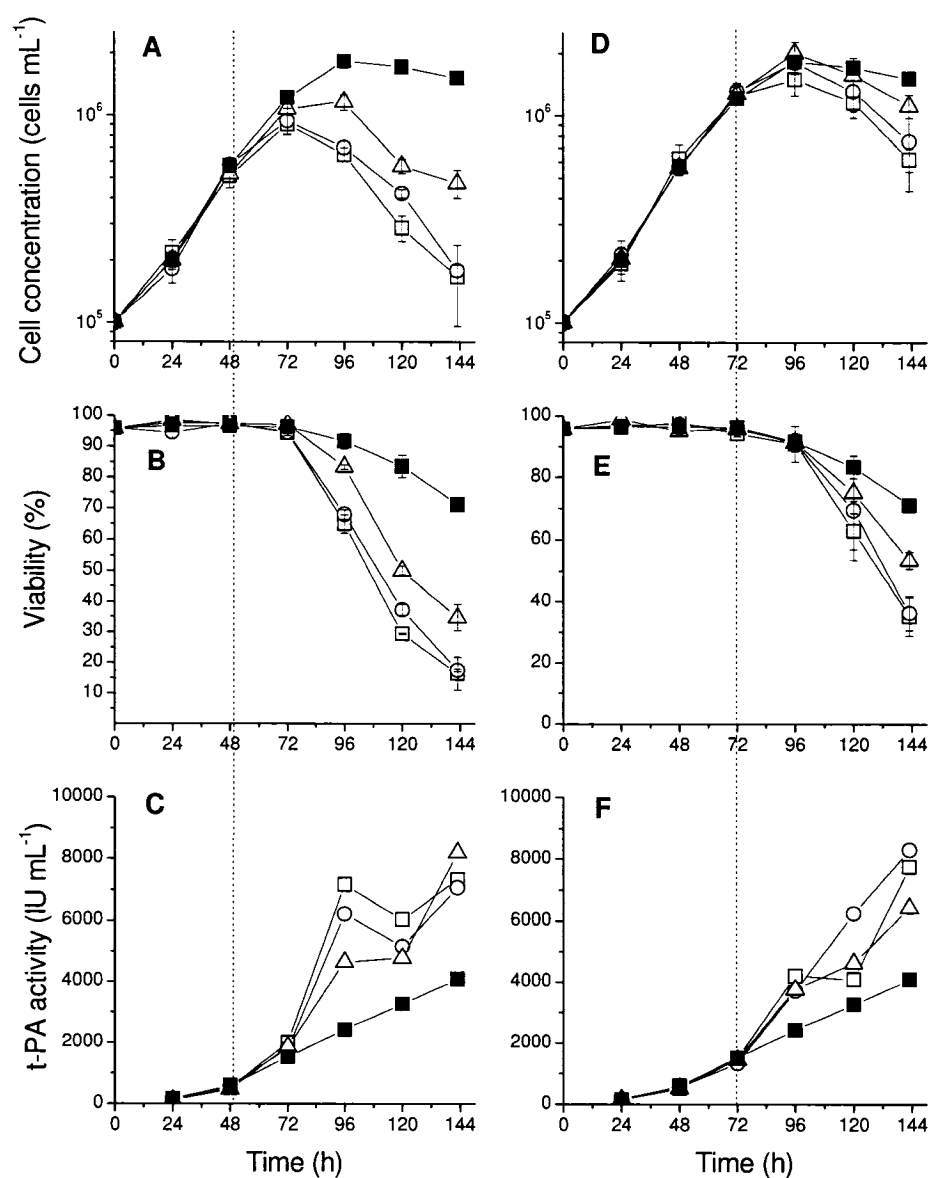
### 4.2.4. Results and Discussion

#### *4.2.4.1. 1 mM Na-butyrate Inhibits Cell Growth and Enhances t-PA Production*

##### T-flasks cultures

Na-butyrate (NaBu) was added at different concentrations in T-flask cultures (Figure 4.1) in order to determine the dose at which Na-butyrate has limited cytotoxic effect while enhancing cell productivity in t-PA. Effect of perturbing the cells at exponential growth phase (48 h) and at late exponential growth phase (72 h) was also assessed. Na-butyrate caused a decrease in cell viability and an increase in t-PA production (in terms of activity units) at all Na-butyrate concentrations tested. There was a clear effect of Na-butyrate concentration on cell viability from 1 mM to 3 mM and 5 mM Na-butyrate, a range of concentrations that has been previously proposed (Hendrick et al. 2001). Interestingly, cell viability has decreased similarly for both Na-butyrate additions at 48 and 72 h when comparing results in terms of hours post-Na-butyrate addition. Higher productions in t-PA were reached with 1.5-2-folds increase compared to the control culture, irrespectively of the time at which Na-butyrate has been added. However, t-PA

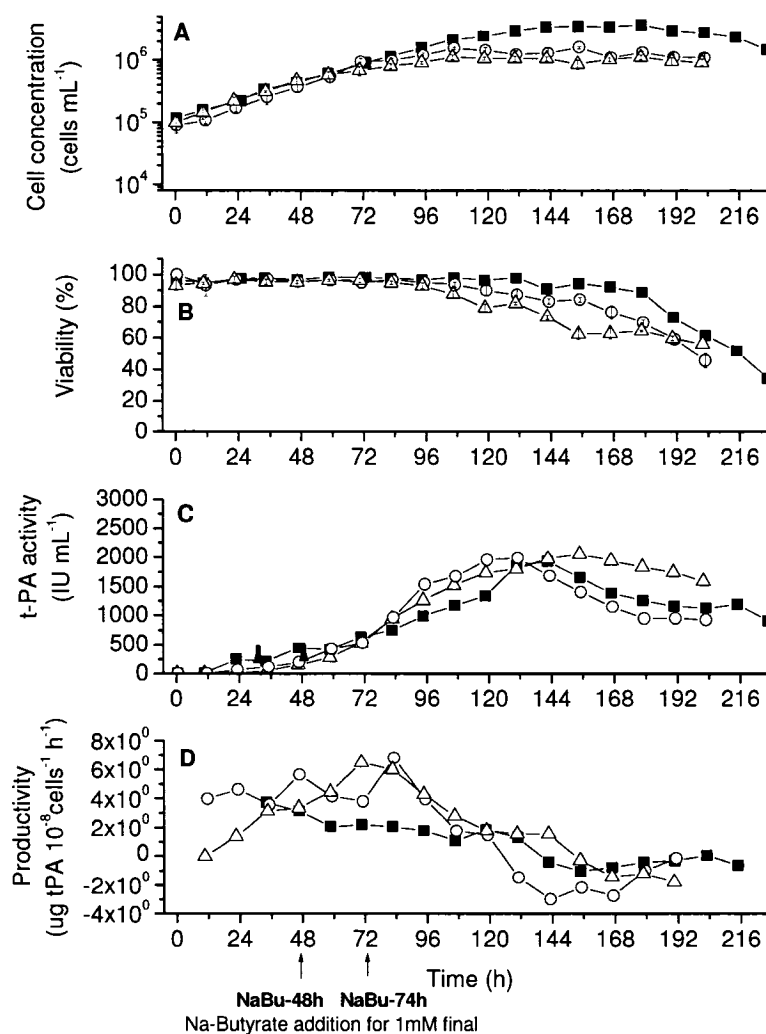
concentration increased 0 - 12 h following the addition at 72 h while it was delayed by 24 h for the addition at 48h. Results suggest that 1 mM, the lower Na-butyrate concentration assessed, showed the lower effect on cell viability while increasing t-PA production. A concentration of 1 mM Na-butyrate, which has also been proposed by Oh et al. (2005), was used in the remaining of this study.



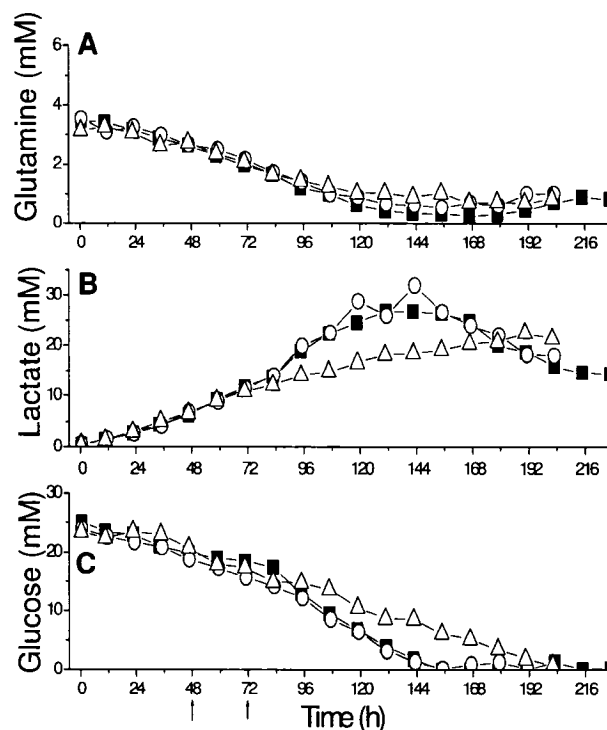
**Figure 4.1** Cell concentration (A-D), cell viability (B-E) and t-PA concentration (C-F) in t-flask cultures. Na-butyrates (NaBu) was added after 48 h (A-C) or 72 h (D-F) for a final concentration of 1mM (Δ); 3mM (○); 5mM (□). A control culture without Na-butyrates addition was also performed (■). Values are average of 3-4 counts per sample for A, B, D and E and that from 2 distinct experiments for 0mM. Error bars are standard error of the mean (SEM).

### Bioreactor cultures

The cells growth behaviour for the control bioreactor culture (Figure 4.2A) showed to be similar to that observed in T- flasks (Figure 4.1A and D). Therefore, Na-butyrate was added to the bioreactor cultures at mid-exponential growth phase (*NaBu-48h*) and at the end of exponential phase (*NaBu-74h* instead of 72 h for practical reasons) such as in T- flasks. Addition of Na-butyrate resulted in lower maximum cell densities. The viable cell density increased from  $1.0 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> (at inoculation) to  $3.4 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> after 143 h for the control culture, and to  $1.1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> (*NaBu-48h*) and  $1.6 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> (*NaBu-74h*) after 84 h and 84-107 h respectively. A longer plateau phase was observed in bioreactor as compared to T-flasks and this may have resulted from the control of culture conditions such as pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pH, in the bioreactor. Na-butyrate caused a decrease in cell viability below 95 % 60 hours after its addition (Figure 4.2B). In the control culture, viability was maintained over 95 % until entry in the plateau phase at 143 h. Na-butyrate has been observed to block cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and therefore stop cell cycle and division (Cherlet and Marc 2000; Hendrick et al. 2001). Glucose consumption and lactate production rates seemed to be similar for both the control and *NaBu-74h* cultures but slower rates were observed from 84 h (at growth cessation) for *NaBu-48h* culture (Figure 4.3).



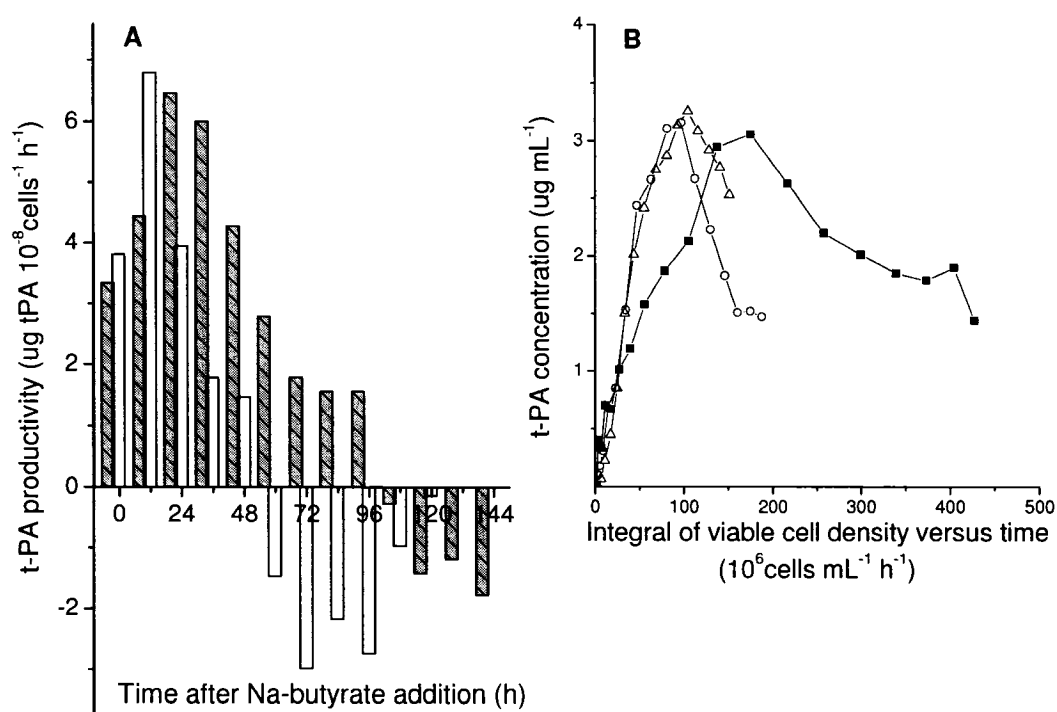
**Figure 4.2** Cell concentration (A), cell viability (B), t-PA concentration (C), cell specific productivity (D) in bioreactor cultures. Arrows indicate Na-butyrate addition at 48 and 74 h. Control (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○). Values are average of 3-4 counts per sample for A and B. Relative errors in (C) were of 3.5% to 5.0%. Arrows indicate the additions of Na-butyrate at 48h or 74h.



**Figure 4.3** Medium concentration in glutamine (A), lactate (B) and glucose (C) in bioreactor cultures. Control (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○). Relative errors were of 1.9-2.5% (B) and of 1.7 to 4.4% (C). Arrows indicate Na-butyrate addition at 48 and 74 h.

For the first 48 hours, the three cultures showed a similar specific t-PA production rate of  $3.7 \pm 0.4 \mu\text{g t-PA } 10^{-8} \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Figure 4.2D and Figure 4.4B). For both bioreactor cultures submitted to Na-butyrate, the specific t-PA production rate increased after Na-butyrate addition and then stayed at a higher production rate until 107 h as compared to the control culture. Na-butyrate caused an increase of 1.5 fold in the cells specific t-PA productivity compared to the control culture (Figures 4.2D and 4.4B). The addition of Na-butyrate at 48 h during the exponential phase showed a higher efficiency at stimulating cells productivity in recombinant proteins than for 74 h, which corresponded

to late exponential phase. The cells may have been in a more receptive physiological state to Na-butyrate when at exponential phase than at the early plateau phase.



**Figure 4.4** tPA productivity with time after Na-butyrate addition in bioreactor cultures. NaBu-48h (grey bars); NaBu-74h (white bars) (A) and active t-PA concentration as a function of the integral of viable cells in bioreactor cultures (B). For A, the productivity at each point was calculated by centered differences using the two adjacent points. Control (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○). For B, t-PA production rate is estimated by the slope of the concentration of active t-PA versus the integral under the growth curve as suggested by Renard et al. (1988) to measure antibody production rate.

Maximum t-PA production rates for the three cultures were then observed, surprisingly, at 84 h post-inoculation; corresponding to 36 h and ~12 h post-Na-butyrate addition for NaBu-48h and NaBu-74h cultures, respectively (Figure 4.4A). t-PA production rates were then decreasing from 120 h post-inoculation and reached negative net values at around 168 h. At ~156 h both glucose and glutamine have been exhausted for the control



and the *NaBu-74h* cultures, while glucose was only exhausted from the culture medium at ~204 h for the *NaBu-48h* culture. However, glutamine showed to stabilize at ~0.9 mM from 120 h at higher values than for the control and the *NaBu-74h* cultures. It then seems that cell entry in the plateau phase has reduced glutamine uptake but not glucose uptake for the *NaBu-48h* culture. Therefore, Na-butyrate addition at 48 h post-inoculation, and to a lesser extent for *NaBu-74h*, has strongly affected the cells as compared to the control culture, and caused significant differences in cells behaviour. Effect of Na-butyrate addition at 74 h post-inoculation may have thus been damped by the cells physiological state which was already close to growth arrest condition.

Contrarily to T-flask cultures, extracellular t-PA concentration in bioreactors exhibited two distinct phases with a production phase followed by a net degradation phase (Figure 4.2C). The control culture maintained a positive specific production rate during exponential growth and then it decreased reaching negative value, suggesting t-PA degradation, when cells viability showed to decrease. This net decrease in extracellular t-PA concentration may be attributed to a combination of multiple factors. It could be due to degradation or inactivation processes from protease cleavage (Hendrick et al. 2001; Yoon et al. 2005; Lin et al. 1993). It is also known that culture conditions (Schweikart et al. 1999), bioreactor geometry, the materials that are used or even shear stress (Senger and Karim 2003; Keane et al. 2003) can result in a variation in the glycosylation pattern (Yun and Gyun 2005), which affects t-PA activity and thus its quantification when the assay is based on bioactivity such as in this study. Electrostatic

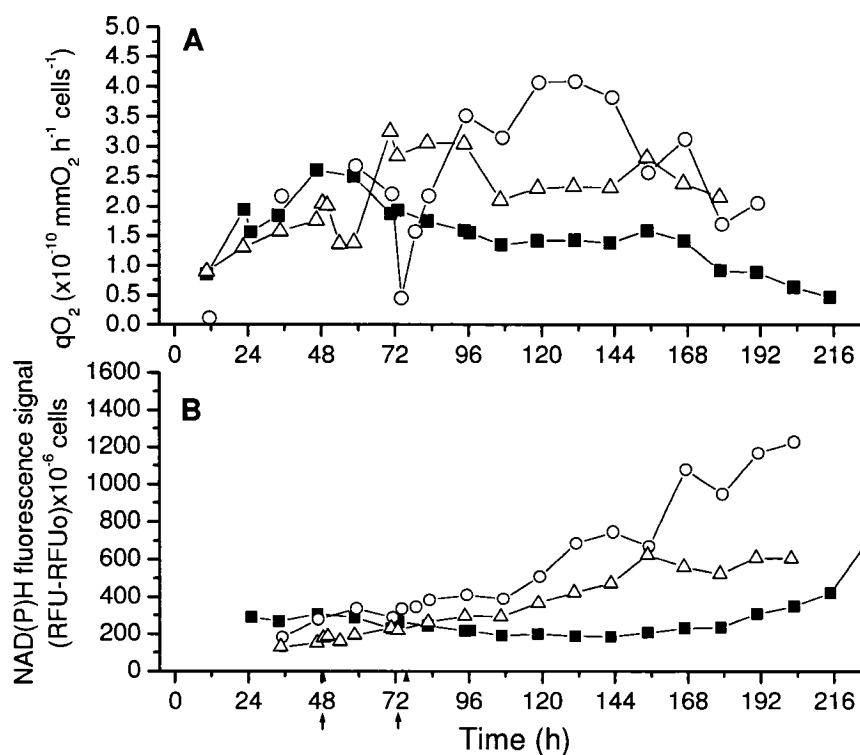
forces can favor protein adsorption on diverse surfaces such as glass (Doran 2006) and stainless steel (Zhang et al. 2001), which may result in conformational changes causing denaturation and/or inactivation. t-PA degradation by proteolytic activity or its adsorption on stainless steel surfaces has been assessed by incubating at 37 °C centrifuged spent media (cell free) from each sample of the bioreactor cultures, supplementing with penicillin/streptomycin antibiotics (10 000 units). Surprisingly, there was no further t-PA degradation in T-flasks, with or without 316 L stainless steel disks (data not shown). However, addition of Na-butyrate did not affect specific activity of fibrinogen fragment produced by CHO cells (Palermo et al. 1991) neither t-PA protein structure produced by hybridoma cells (Cherlet and Marc 2000). Besides culture parameters such as pO<sub>2</sub> and pH control, cells sensitivity to shear stress may be involved in t-PA degradation in bioreactor cultures and should then be further investigated.

#### 4.2.4.2. *Na-butyrate Addition Enhances Cell Metabolic Activity*

##### The cells respiration rate responds to Na-butyrate addition

Both Na-butyrate additions at 48 h and 74 h showed to first cause a punctual (< 6 h) and rapid decrease of the cells specific oxygen consumption rate (qO<sub>2</sub>) followed by a rapid increase 48 hours after Na-Butyrate addition at  $\sim 3.3 \pm 0.1 \times 10^{-10} \text{ mmolO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$  (Figure 4.5A). Values then fluctuated but remained higher than that for the control culture with  $3.5 \pm 0.6$  (*NaBu-74h*),  $2.7 \pm 0.4$  (*NaBu-48h*) and  $1.5 \pm 0.1$  (Control)  $\times 10^{-10} \text{ mmolO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ . qO<sub>2</sub> values showed to stay constant in the transition period from exponential phase to the plateau growth (120 h-168 h) and then regularly decreased until the end of the culture. In complement, fluorescence signal corresponding to NAD(P)H

was monitored *in-situ* using a multiwavelength fluorescence probe (Hisiger and Jolicoeur, 2005). Interestingly, the NAD(P)H fluorescence signal per  $10^6$  cells followed similar trends than that for  $qO_2$  (Figure 4.5B). These results suggest that the addition of Na-butyrate caused an increase in the cells metabolic activity which can be monitored on-line through the cells oxygen consumption rate. However, it should be noted that the culture exhibiting the highest t-PA productivity (*NaBu-48h*) showed higher  $qO_2$  and NAD(P)H/ $10^6$  cells values than for the control culture but lower values than for the *NaBu-74h* culture.

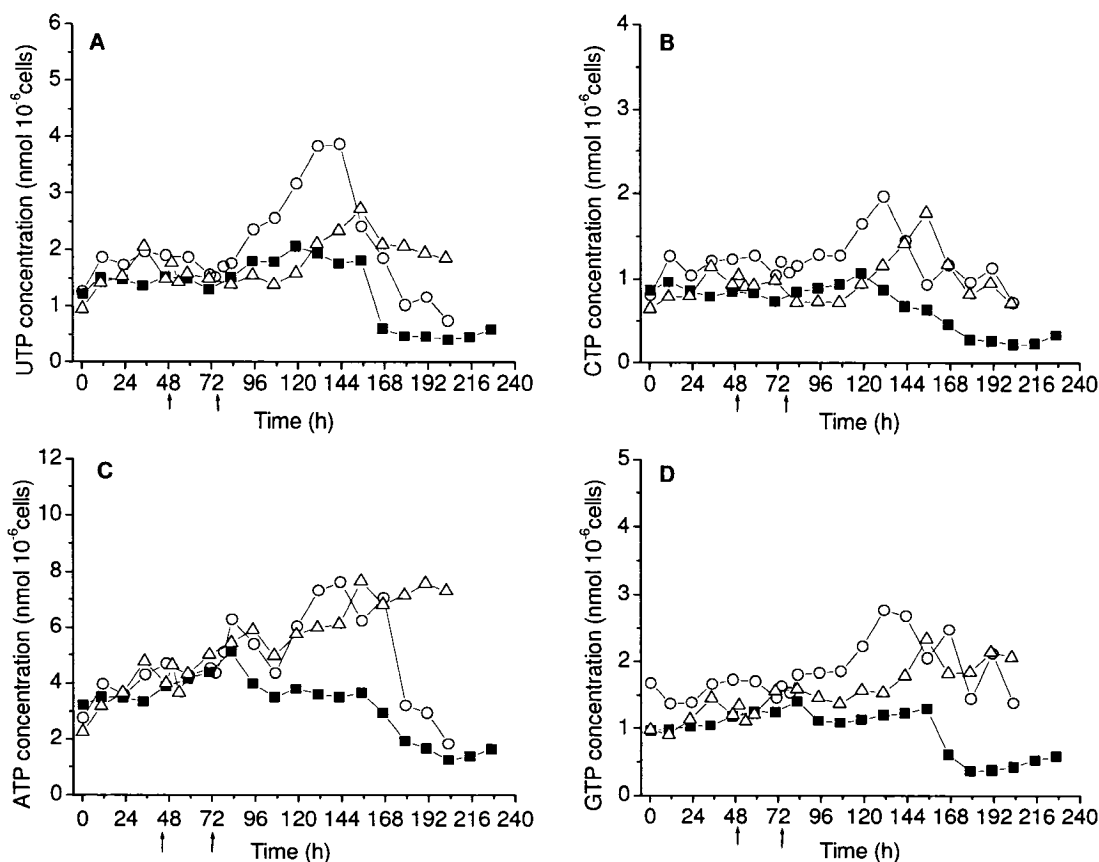


**Figure 4.5** Specific oxygen uptake rate ( $qO_2$ ) (A) and NAD(P)H fluorescence signal reported per cell (B) in bioreactor cultures. Control (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○). Arrows indicate the additions of Na-butyrate at 48h or 74h.

### Triphosphate nucleotides concentrations

Specific triphosphate nucleotides concentrations in all three bioreactor cultures increased the first 24 h post-inoculation (Figure 4.6), a phenomenon which can be attributed to an inoculation shock transferring the cells from a used to a fresh culture medium. For the control culture, cell contents in both ATP and GTP increased during exponential growth phase and reached maximum values at 86 h, and then they both decreased at their initial values and stayed quite constant from ~107-156 h after which they both rapidly decreased at low levels. UTP and CTP have only increased from 86 h to 120 h and then showed to decrease (CTP) or remained constant until 156 h and then decrease (UTP). Addition of Na-butyrate has clearly affected the cells metabolic behaviour and triphosphate nucleotide pools. Only the major trends observed are presented and discussed. Immediately after Na-butyrate addition there was an increase in the cells ATP and CTP contents for both *NaBu-48h* and *NaBu-74h* cultures. This sudden increase in ATP cell content coincided with the observed short-term increase in cell respiration rate ( $qO_2$ ; see above). Butyric acid has been seen to be consumed by hybridoma cells and then be used in the  $\beta$ -oxidation pathway of fatty acids to acetyl-CoA (Cherlet and Marc 2000). An increase in acetyl-CoA may push on cells respiration chain and favour ATP production. It is also known that cell energetic demand can increase under a stress (Ozturk et al. 1992) and this may have also been involved in this work. With Na-butyrate, ATP and GTP concentrations reached higher values than for the control at 84 h. Both nucleotide concentrations then decreased from 84 to 107 h, while following control culture behaviour, except for GTP in the *NaBu-74h* culture in which it stayed

constant at high value within that time period. For the same time period (84-107 h) UTP and CTP concentrations in *NaBu-48h* culture stayed constant and at lower values than for the control culture, while these nucleotides increased in the *NaBu-74h* culture. Triphosphate nucleotides then reached maximum values at the plateau phase with a ~24 h delay between *NaBu-74h* (132-144 h) and *NaBu-48h* (156 h). Interestingly, ATP and UTP in *NaBu-74h* culture decreased to the low final values measured in the control culture while all nucleotides remained at high concentrations in the *NaBu-48h* culture, even if there was a slight decrease at 156 h. Cell ATP level has also been proposed to evaluate viable cell concentration (Sonderhoff et al. 1992), but it is clear in this work that ATP concentration is not constant in CHO cells even along the exponential growth phase.



**Figure 4.6 Intracellular concentration in triphosphate nucleotides with time in bioreactor cultures. Control (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○). Data were reported to the viable cell concentration. Arrows indicate the additions of Na-butyrate at 48h or 74h. n=3. Arrows indicate the additions of Na-butyrate at 48h or 74h.**

As the cells stop dividing, no DNA replication occurs as well as numerous other anabolic reactions, which combination of phenomenon may result in a decrease of the demand for energy shuttles such as triphosphate nucleotides. Therefore, one could expect that the cells regulatory mechanisms should have naturally decreased triphosphate nucleotide pools when growth was reduced. For the control culture, ATP reduced from 86 h but CTP only reduced from 120 h and UTP and GTP from 156 h,

showing potentially different regulatory behaviours for these four nucleotides. Under Na-butyrate addition, however, CTP, UTP and GTP concentrations have all promptly increased at 84-107 h and then decreased from 144 h for the *NaBu-74h* culture. A similar behaviour was observed for the *NaBu-48h* culture but with a 24-36 h delay for the *NaBu-74h* culture, during which, CTP, UTP and GTP concentrations stayed constant at lower values than for the control (UTP and CTP) or higher than the control but lower than for the *NaBu-74h* culture (ATP and GTP). It is thus interesting to note that the time period corresponding to positive net t-PA productivity for the *NaBu-48h* culture (48-120 h) as well as for the *NaBu-74h* culture (74-120 h) did not coincided with the highest concentrations in triphosphate nucleotides. High t-PA productivity occurred at lower to similar cell content in triphosphate nucleotides as compared to the control culture. The long-term increase in cell respiration rate following Na-butyrate addition suggested the increase of the cell metabolic activity, as already mentioned. This higher cell metabolic activity has not resulted in higher nucleotides cell content during growth phase which may rather suggest a higher capacity for nucleotides turnover rates during that time period (< 86-120 h). Na-butyrate addition may have generated a higher metabolic stability with, possibly, increased fluxes of cycling and futile pathways supporting nucleotide turnover as well as anabolic reactions such as protein synthesis. This hypothesis, which is further discussed in the next sections is also supported by the fact that lower glucose uptake rate and lactate production rate were observed for the *NaBu-48h* culture, while ATP and NAD(P)H cells contents showed to be higher than for the control culture.

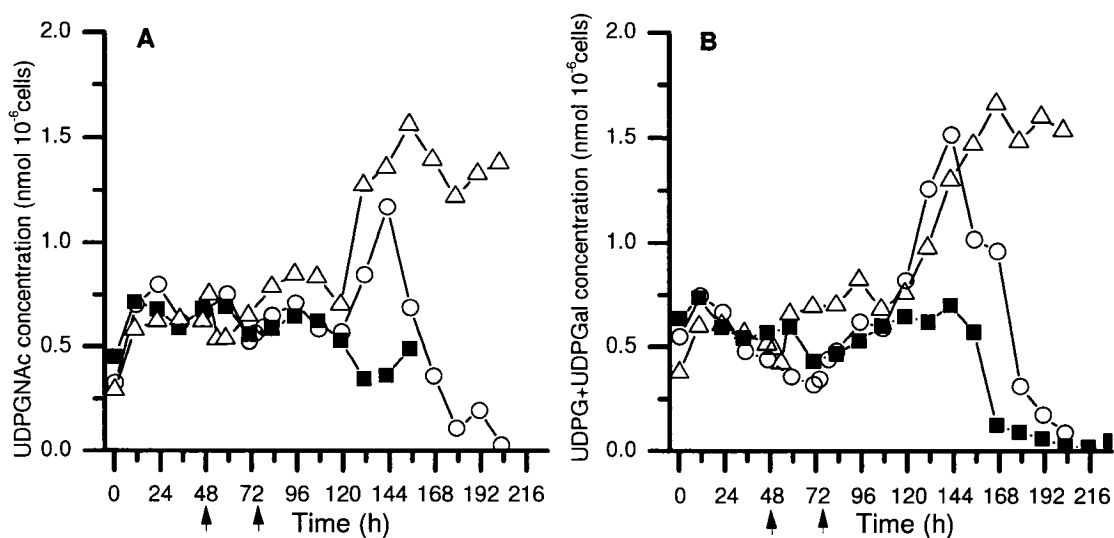
Even though Na-butyrate has shown to increase the production in t-PA, little effect on total protein concentration and production rate have been reported (Kooistra et al. 1987). It does not specifically target t-PA gene, but 2 % of mammalian genes expression is being modified (Van Lint et al. 1996). Proteins synthesis have been reported to be the main ATP-consumption channel with 30 % of total ATP consumption for tumour cells cultured in an amino-acid enriched medium (Müller et al. 1986). Other nucleotides were also at higher levels than that for the control culture, which may have maintain a favourable intracellular environment for protein production, such as t-PA.

#### Nucleoside diphosphate sugars concentrations

The activated N-acetyl amino sugars are mainly involved in the formation of sugar side chains in glycoproteins and glycolipids. Increase in UDPGNAc cell content is often associated with a decrease in UTP ( $\text{Amino sugar} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-GNAc} + \text{P}_i$ ). Surprisingly, as for the triphosphate nucleotides, both UDPGNAc and UDPG+UDPGal increased rapidly within the first 24 h post-inoculation for the three cultures, reaching a first maximum at 12 h (Figure 4.7). For both UDPGNAc and UDPG+UDPGal, addition of Na-butyrate at 48 h resulted within 12 h in higher nucleoside concentrations than both *NaBu-74h* and the control cultures. Then at 120 h, both nucleosides increased rapidly and reached maximum values at 144 h for the *NaBu-74h* culture and at 156 h for the *NaBu-48h* culture. The control and *NaBu-74h* cultures behaved similarly for both nucleosides until 107 h. *NaBu-74h* culture showed similar behaviour than that previously presented for ATP and UTP with a sharp increase at 120-144 h and then a



decrease from 144 h down to the value for the control culture. *NaBu-48h* culture maintained high nucleoside cell contents; similarly than the behaviour for the four nucleotides that have been measured (Figure 4.6). The role of these nucleosides on the cells productivity in recombinant protein still has to be confirmed. UDPGNac cell content has been correlated to specific monoclonal antibody production (Barnabé and Butler 1994), but the same authors also found that increase productivity could be due to a reduction in cell growth rather than UDPGNac accumulation (Barnabé and Butler 1998).

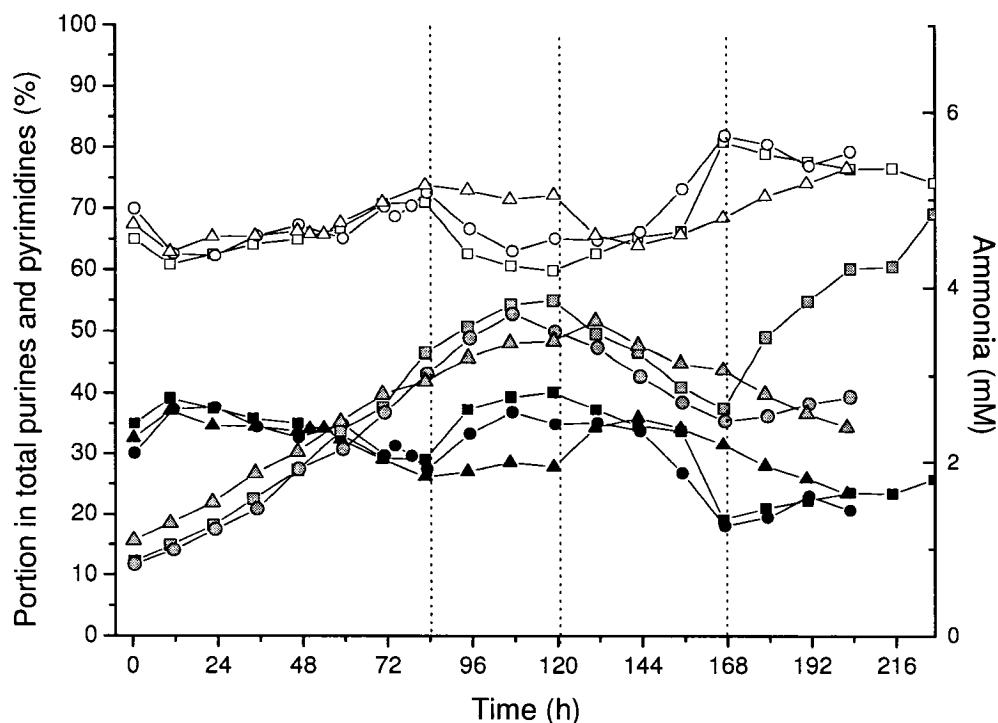


**Figure 4.7** Intracellular concentration in UDP-sugars with time in bioreactor cultures. Control (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○). Data were reported to the viable cell concentration. Arrows indicate the additions of Na-butyrate at 48h or 74h. n=3. Arrows indicate the additions of Na-butyrate at 48h or 74h.

#### *4.2.4.3. Analysis of nucleosides and nucleotides ratios*

##### Purines and pyrimidines

Pyrimidines (CTP+UTP+UDPGNac) are involved in different anabolic reactions and metabolic processes that are mostly growth-related, such as membrane lipid synthesis, strand break repair and protein glycosylation. Purines (ATP+ADP+AMP+GTP) are energy-related nucleotides. Interestingly, the extracellular ammonia concentration followed percentage in pyrimidines with time. Variations of the percentage in total purines and in total pyrimidines coincided with the changes observed in the cells growth phases previously used as reference time points: 84 h (end of exponential phase), 120 h (early plateau phase) and 168 h (decrease in cell viability) (Figure 4.8). However, these variations were clearly damped when using Na-butyrate. Addition of Na-butyrate at 48 h seemed to cause purines and pyrimidines to sustain between 84-120 h; smoothing the evolution of the two pools for the whole culture duration. This result thus supports the hypothesis that adding Na-butyrate to metabolically active cells at exponential growth may enhance the cells metabolic activity by conferring a higher stability to the cells metabolism.



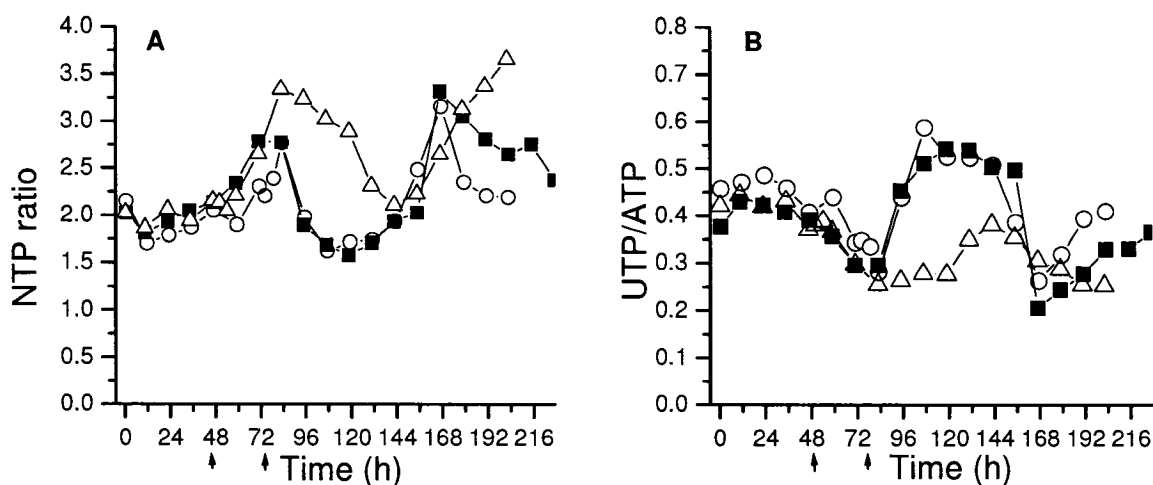
**Figure 4.8** Percentage in purines (ATP+ADP+AMP+GTP) (open symbols) and pyrimidines (CTP+UTP+UDPGNAC) (closed symbols) to the total intracellular cell content in nucleotides with time and extracellular ammonia (grey symbols) in bioreactor cultures. Control ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ); NaBu-48h ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ); NaBu-74h ( $\circ$ ,  $\bullet$ ). Dotted lines indicate switch in cell metabolism. For ammonia, relative errors were evaluated for one point of each curves and vary between 0.3% and 2.2%.

#### NTP and UTP-to-ATP Ratios

NTP ratio represents energy-related nucleotides to the anabolism-related nucleotides. NTP ratio showed a similar behaviour than that for purines (Figure 4.9). *NaBu-48h* culture clearly exhibits higher values at growth arrest (84 h) and until the plateau growth (144 h) as compared to *NaBu-74h* and control cultures. A decrease in the NTP ratio at the end of the exponential growth phase has also been reported for a mouse-mouse hybridoma cell line (Ryll and Wagner 1992). However, NTP ratio increased during the plateau phase (120-156 h) in all cultures, reaching the value observed at 84 h. Then, this

ratio decreased again for both *NaBu-74h* and control cultures while it continued to increase for *NaBu-48h* culture. These results suggest that cells submitted to Na-butyrate at mid-exponential growth phase (48 h) maintained a higher energetic state.

UTP-to-ATP ratio followed the trend observed for the percentage in pyrimidines with time (Figure 4.9). Compared to both the control and *NaBu-74h* cultures, *NaBu-48h* culture showed to maintain UTP-to-ATP ratio from growth cessation (84 h) to late plateau phase (156 h). UTP-to-ATP ratio is a critical factor for cell growth and DNA synthesis (Chou and Rapaport 1984) and large increases in the UTP-to-ATP ratio in the case of the activation of DNA synthesis have been reported. Weisman et al. (1988) induced growth inhibition by adding adenine nucleotide to a mouse fibroblast culture; elevated intracellular adenine nucleotide levels and reduced intracellular UTP levels were then measured. However, the rapid increase in UTP-to-ATP ratio observed at 84 h for the *NaBu-74h* and the control cultures is not due to activation of cell division processes but may be related to a decoupling in both ATP and UTP concentrations regulation at the initiation of growth arrest. However, induction of a metabolic stability in the *NaBu-48h* culture may explain that the cellular regulatory capacity was maintained even is the cells have stopped dividing.

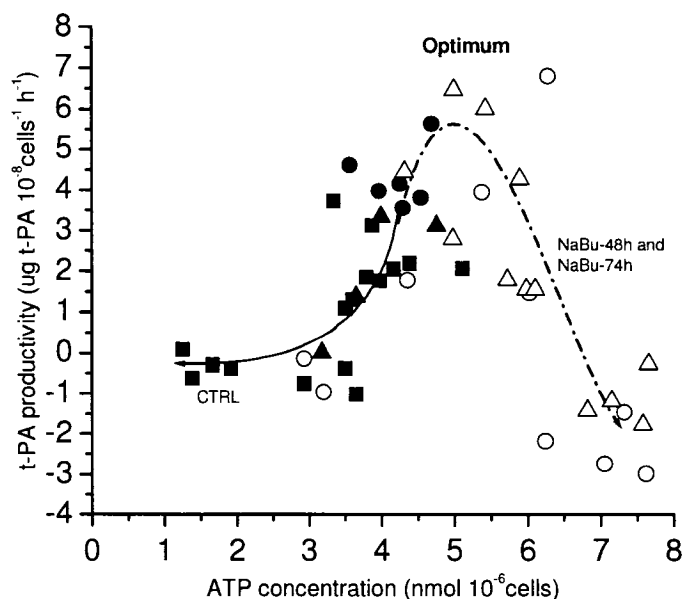


**Figure 4.9** NTP ratio (A) and UTP/ATP ratio (B) with time in bioreactor cultures. Control (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○). Arrows indicate the additions of Na-butyrate at 48h or 74h.

#### 4.2.4.4. The Cells Energetic Capacity Reflects the Productivity Potential for t-PA

The cells energy charge ( $((\text{ATP} + 0.5 \text{ ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}))$ ) evolved similarly for the three cultures and remained higher than 0.85, but showed to decrease when cell viability reached values below 60 % (at 155 h for *NaBu-48h* and 202 h for *NaBu-74h*; data not shown). Cells t-PA productivity increased with intracellular ATP after Na-butyrate addition and then has decreased when the cells started to die (Figure 4.10). Similar trend was observed for the other triphosphate nucleotides, ADP, AMP and UDP-hexoses (data not shown). All cultures exhibit low ATP level and t-PA productivity before Na-butyrate addition. Then, Na-butyrate addition resulted in an increase in ATP cell content while a positive effect on t-PA productivity can only be seen for the time period 72-84 h. The productivity in t-PA reached its maximum at an ATP cell content of  $\sim 5 \text{ nmol } 10^{-6} \text{ cells}$ ,

and then declined while cell ATP content was still increasing. This concentration of ~5 nmol ATP  $10^{-6}$  cells may be metabolically relevant because it coincided with maximum t-PA specific productivity for all cultures with and without Na-butyrate. This observation of a relationship between the cells ATP level and t-PA productivity agrees with the work of Tagaki et al. (2001) as well as with others on the production of bioproducts such as reovirus (Burgener et al. 2006) and monoclonal antibodies (Lin et al. 1999; Oh et al. 1995; Balcarcel et al. 2003). However, the metabolic state at which the cells were stressed with Na-butyrate whether at mid-exponential growth (48 h) or late-exponential growth (74 h) phases seemed to have been the determinant factor in the cells behavior. This result may support the findings of Henry et al. (2005) who suggested that the net ATP flux is correlated to the level of adenovirus viral vectors production in HEK-293 cells.



**Figure 4.10** Cell t-PA productivity as a function of the cells specific content in ATP in bioreactor cultures, before (closed symbols) and after (open symbols) Na-butyrate treatment. The solid arrow indicates the decreasing pattern for the control culture. The dashed-dotted arrow indicates the increasing pattern following the supplementation and the decreasing pattern caused by cell death and t-PA inactivation for the cultures NaBu-48h and NaBu-74h. Control (■); NaBu-48h (▲,△); NaBu-74h (●,○).

#### 4.2.5. Conclusion

It has been shown that the addition of 1 mM Na-butyrate to CHO cells resulted in a 1.5-fold increase of the maximum specific t-PA production rate, and that for both cultures with Na-butyrate addition either at mid-exponential phase (48 h post-inoculation) or at the end of the exponential phase (74 h post-inoculation). Surprisingly, maximum specific productivity in t-PA was observed at growth cessation (84 h) for all three cultures, with or without Na-butyrate. High productivity level in t-PA was sustained for

Na-butyrate addition at 48 h as compared to 74 h. Analysis of nucleotide concentrations showed clear distinct effects of Na-butyrate when added at mid-exponential phase as compared to at the end of the exponential phase. Intracellular nucleotide concentrations and ratios are known to evolve with cell culture growth phase. Meyer and Wagner (1985) and Ryll and Wagner (1992) have observed significant changes in intracellular nucleotide pools and ratios for plant cell suspension cultures and mammalian cells, respectively. Fluctuations in nucleotide pools level have also been shown to correlate with cell cycle (de Korte et al. 1987; Rapaport et al. 1979) and proliferation, differentiation and transformation to the malignant state of myeloid leukemia cells and HL-60 cells (de Korte et al. 1987). However, our observations on the percentage of pyrimidines (and purines), NTP and UTP-to-ATP ratios suggest that adding Na-butyrate to metabolically active cells at mid-exponential growth phase may confer a higher stability to the cells metabolism, which in turn may contribute to the observed damping of the natural cell regulatory processes. In parallel, the cells showed a durable increase in their specific oxygen consumption rate ( $qO_2$ ) following Na-butyrate addition. However, it was surprising that cells stressed with Na-butyrate at mid-exponential growth phase showed lower nucleotide concentrations, lower specific respiration rate and lower glucose consumption and lactate production rates. Therefore, the hypothesis of a higher cell metabolic stability generated by Na-butyrate on active cells may be explained as higher turnover rates in ATP and of other nucleotides maximizing futile cycles. Moreover, analysis of a relationship between the cells ATP concentration and t-PA specific productivity suggests that net ATP flux may be decoupled from cell



regulation. In a further study, characterisation of the metabolic flux distribution and control shall be performed in order to better understand the phenomenon involved.

#### 4.2.6. Nomenclature

ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
ATP	Adenosine triphosphate
CTP	Cytidine triphosphate
Energy charge	$\frac{ATP + 0,5ADP}{ATP + ADP + AMP}$
GTP	Guanosine triphosphate
NaBu-74h	Batch culture with 1 mM Na-butyrate addition at 74 h
NaBu-48h	Batch culture with 1 mM Na-butyrate addition at 48 h
NTP ratio	$\frac{(ATP + GTP)}{(UTP + CTP)}$
Percentage in total pyrimidines	$\frac{CTP + UTP + UDPGNac}{ATP + ADP + AMP + GTP + CTP + UTP + UDPGNac}$
Percentage in total purines	$\frac{ATP + ADP + AMP + GTP}{ATP + ADP + AMP + GTP + CTP + UTP + UDPGNac}$
$q_{t-PA}$	Specific t-PA production ( $\mu\text{g } 10^{-8} \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
$q_{O_2}$	Specific oxygen uptake rate ( $\text{mmol } O_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ )
UDP	Uridine diphosphate
UDPG	UDP-glucose

UDPGal	UDP-Galactose
UDP-Gal-Nac	UDP- <i>N</i> -acetyl-galactosamine
UDP-Glc-Nac	UDP- <i>N</i> -acetyl-glucosamine
UDPGNAc	Sum of UDP-GlcNac and UDP-GalNac
UTP	Uridine triphosphate

#### 4.2.7. Acknowledgment

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by Cell-Net, a research network funded by NSERC and industrial partners. The authors also acknowledge Dr. M. Butler of the University of Manitoba for CHO producing t-PA cell line adapted to serum-free Biogro-CHO culture medium, Dr. J. Scharer of the University of Waterloo for providing a t-PA enzymatic assay protocol, and M. Ben-Tchavtchavadze for technical help.

#### 4.2.8. References

Balcarcel, R.S., Clark, L.M. (2003) Metabolic screening of mammalian cell cultures using well-plates. *Biotechnol. Prog.* 19:98-108.

Barnabé, N. and Butler, M. (1994) Effect of temperature on nucleotide pools and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1235-1245.

- Barnabé, N. and Butler, M. (1998) The relationship between intracellular UDP-N-acetylhexosamine nucleotide pool and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma . J. Biotechnol. 60, 67-80.
- Boffa, L.C., Vidali, G., Mann, R.S., and Allfrey, V.G. (1978) Suppression of histone deacetylation *in vivo* and *in vitro* by sodium butyrate. J. Biol. Chem. 253, 3364-3366.
- Bollati-Fogolín, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H.S., Etcheverrigaray, M., and Kratje, R. (2005) Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: Effects on productivity and product quality. Biotechnol. Prog. 21, 17-21.
- Bordonaro, M., Mariadason, J.M., Aslam, F., Heerdt, B.G., and Augenlicht, L.H. (1999) Butyrate-induced apoptic cascade in colonic carcinoma cells: modulation of the  $\beta$ -Catenin-Tcf pathway and concordance with effects of sulindac and trichostation A but not curcumin. Cell Growth Differ. 10, 713-720.
- Burgener, A., Coombs, K., and Butler, M. (2006) Intracellular ATP and total adenylate concentrations are critical predictors of reovirus productivity from vero cells. Biotechnol. Bioeng. 94, 667.
- Candido, E.P.M., Reeves, R., and Davie, J.R. (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. Cell 14, 105-113.

Cherlet, M. and Marc, A. (2000) Stimulation of monoclonal antibody production of hybridoma cells by butyrate: evaluation of a feeding strategy and characterization of cell behaviour. *Cytotechnology* 32, 17-29.

Chou, I.-N.Z.J. and Rapaport, E. (1984) Imbalance of total cellular nucleotide pools and mechanism of the colchicine-induced cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 2401-2405.

Cousens, L.S., Gallwitz, D., and Alberts, B.M. (1979) Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *J. Biol. Chem.* 254, 1716-1723.

Davie, J.R. (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* 133, 2485S-2493S.

de Korte, D., Haverkort, W.A., de Boer, M., van Gennip, A.H., and Roos, D. (1987) Imbalance in the nucleotides pools of myeloid leukemia cells and HL-60 cells: correlation with cell-cycle phase, proliferation, differentiation, and transformation. *Cancer Res.* 47, 1841-147.

Doran, P.M. (2006) Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption. *J. Biotechnol.* 122, 39-54.

Dorner, A.J., Wasley, L.C., and Kaufman, R.J. (1989) Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 264, 20602-20607.

Grummt, F., Paul, D., and Grummt, I. (1977) Regulation of ATP pools, rRNA and DNA synthesis in 3T3 cells in response to serum or hypoxanthine. *Eur. J. Biochem* 76, 7-12.

Hendrick, V., Winnepenninckx, P., Adelkafi, C., Vandeputte, O., Cherlet, M., Marique, T., Renemann, G., Loa, A., Kretzmer, G., and Werenne, J. (2001) Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology* 36, 71-83.

Henry, O., Perrier, M., Kamen, A. (2005) Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors. *Metab. Eng.* 7:467-476.

Hisiger, S. and Jolicoeur, M. (2005) Plant cell culture monitoring using an *in situ* multiwavelength fluorescence probe. *Biotechnol. Prog.* 21, 580-589.

Hunt, L., Batard, P., Jordan, M., and Wurm, F.M. (2002) Fluorescent proteins in animal cells for process development: Optimization of sodium butyrate treatment as an example. *Biotechnol. Bioeng.* 77, 528-537.

Jolicoeur, M., Chavarie, C., Carreau, P.J., Archambault J. (1992). Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* 39:511-521.

Keane, J.T., Ryan, D., and Gray, P.P. (2003) Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 211-220.

Kooistra, T., Van Den Berg, J., Töns, A., Platenburg, G., Rijken, D.C., and Van Den Berg, E. (1987) Butyrate stimulates tissue-type plasminogen-activator synthesis in cultured human endothelial cells. *Biochem. J.* 247, 605-612.

Lin, A.A., Kimura, R., and Miller, W.M. (1993) Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 339-350 .

Lin, J., Takagi, M., Qu, Y., Gao, P., and Yoshida, T. (1999) Metabolic flux change in hybridoma cells under high osmotic pressure. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 255-257.

Meyer, R. and Wagner, K.G. (1985) Nucleotide pools in suspension-cultured cells of *Datura innoxia* L. Changes during growth of the batch culture. *Planta* 166, 439-445.

Müller, M., Siems, W., Buttgereit, F., Dumdey, R., and Rapoport, S.M. (1986) Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells. *Eur. J. Biochem.* 161, 701-705.

Oh, S.K.W., Chua, F.K.S., Choo, A.B.H. (1995) Intracellular responses of productive hybridomas subjected to high osmotic pressure. *J. Biosci. Bioeng.* 87:255-257.

Oh, H.K., So, M.K., Yang, J., Yoon, H.C., Ahn, J.S., Lee, J.M., Kim, J.T., Yoo, J.U., and Byun, T.H. (2005) Effect of N-acetylcystein on butyrate-treated chinese hamster ovary cells to improve the production of recombinant human interferon- $\beta$ -1a. *Biotechnol. Prog.* 21, 1154-1164.

Ozturk, S.S., Riley, M.R., and Palsson, B.O. (1992) Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng.* 39, 418-431.

Palermo, D.P., DeGraaf, M.E., Marotti, K.R., Rehberg, E., and Post, L.E. (1991) Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J. Biotechnol.* 19, 35-48.

Rapaport, E., Garcia-Blanco, M.A., and Zamecnik, P.C. (1979) Regulation of DNA replication in S phase nuclei by ATP and ADP pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 1643-1647.

Renard, J.M., Spagnoli, R., Mazier, C., Salles, M.F., and Mandine, E. (1988) Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems. *Biotechnol. Lett.* 10, 91-96.

Riggs, M.G., Whittaker, R.G., Neumann, J.R., and Ingram, V.M. (1977) *n*-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* 268, 462-464.

Ryll, T. and Wagner, R. (1991) Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells. *J. Chromatogr.* 570, 77-88.

Ryll, T. and Wagner, R. (1992) Intracellular ribonucleotide pools as a tool for monitoring the physiological state of *in vitro* cultivated mammalian cells during production processes. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 934-946.

Schweikart, F., Jones, R., Jaton, J.-C., and Hughesm, G.J. (1999) Rapid structural characterisation of a murine monoclonal IgA  $\alpha$  chain: heterogeneity in the oligosaccharide structures at a specific site in samples produced in different bioreactor systems. *J. Biotechnol.* 69, 191-201.

Sealy, L. and Chalkley, R. (1978) The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* 14, 115-121.

Senger, R.S. and Karim, M.N. (2003) Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnol. Prog.* 19, 1199-1209.

Siano, S.A. and Mutharasan, R. (1991) NADH fluorescence and oxygen uptake responses of hybridoma cultures to substrate pulse and step changes. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 141-159.

Sonderhoff, S.A., Kilburn, D.G., Piret, J.M. (1992) Analysis of mammalian viable cell biomass based on cellular ATP. *Biotechnol. Bioeng.* 39:859-964.



Tagaki, M., Moriyama, T., Yoshida, T. (2001) Effects of shifts up and down in osmotic pressure on production of tissue plasminogen activator by Chinese hamster ovary cells in suspension. *J. Biosci. Bioeng.* 91:509-514.

Van Lint, C., Emiliani, S., and Verdin, E. (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5, 245-253.

Walsh, G. (2005) Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trends Biotechnol.* 23, 553-558.

Weisman, G.A., Lustig, K.D., Lane, E., Huang, N., Belzer, I., and Friedberg, I. (1988) Growth inhibition of transformed mouse fibroblasts by adenine nucleotides occurs via generation of extracellular adenosine. *J. Biol. Chem.* 263, 12367-12372.

Williams, S.P., Newton, R.P., and Brown, E.G. (1987) Analysis of the effects of ethanol, fructose and nicotinamide on the free nucleotides of rat liver using high performance liquid chromatography. *Int. J. Biochem.* 19, 879-884 .

Yoon, S.K., Choi, S.L., Song, J.Y., and Lee, G.M. (2005) Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese Hamster Ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0°C. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 345-356.

Yuk, I.H.Y., Wildt, S., Jolicoeur, M., Wang, D.I.C., and Stephanopoulos, G. (2002) A GFP-based screen for growth-arrested, recombinant protein-producing cells. *Biotechnol. Bioeng.* 79, 74-82.

Yun, H.S. and Gyun, M.L. (2005) Enhanced human thrombopoietin production by sodium butyrate addition to serum-free suspension culture of Bcl-2-overexpressing CHO cells. *Biotechnol. Prog.* 21, 50-57.

Zhang, F., Kang, E.T., Neoh, K.G., Wang, P., and Tan, K.L. (2001) Surface modification of stainless steel by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction of protein adsorption. *Biomaterials* 22, 1541-1548.

## **CHAPITRE 5 : SUIVI PAR SONDE À FLUORESCENCE À LONGUEURS D'ONDES MULTIPLES**

Ce chapitre, ainsi que les suivants, vient compléter l'analyse des résultats présentés dans le manuscrit du chapitre précédent.

### **5.1. Introduction**

Des mesures en temps réel des paramètres de culture sont essentielles au contrôle d'un bioprocédé. Les paramètres environnementaux (oxygène, pH, température,...) sont facilement estimés par l'ajout de sondes au système. Le suivi de la croissance est plus délicat, mais demeure tout de même le principal paramètre indicateur de l'évolution d'une culture. Méthode efficace, le compte cellulaire par échantillonnage régulier et emploi d'un hémocytomètre est malgré tout invasif, long et sensible aux erreurs humaines. En remplaçant ces étapes par des méthodes non-invasives de suivi en ligne, une économie substantielle de temps et possiblement un gain de précision peuvent être réalisés.

Les similitudes observées entre les données de fluorescence de NAD(P)H et les mesures de densité cellulaire obtenues dans nos laboratoires pour des cultures de plantes (Hisiger et Jolicoeur 2005b), de *P. pastoris* et de NS0 (Hisiger et Jolicoeur 2005a) laissent présager la possibilité d'employer cette sonde lors des cultures afin d'estimer en continu la densité cellulaire des cellules CHO dans le réacteur. Ainsi, au cours de ce projet de maîtrise, une sonde à fluorescence à longueurs d'ondes multiples a été ajoutée au

système de culture en bioréacteur afin d'obtenir des mesures en temps réel et ainsi évaluer la pertinence de son emploi.

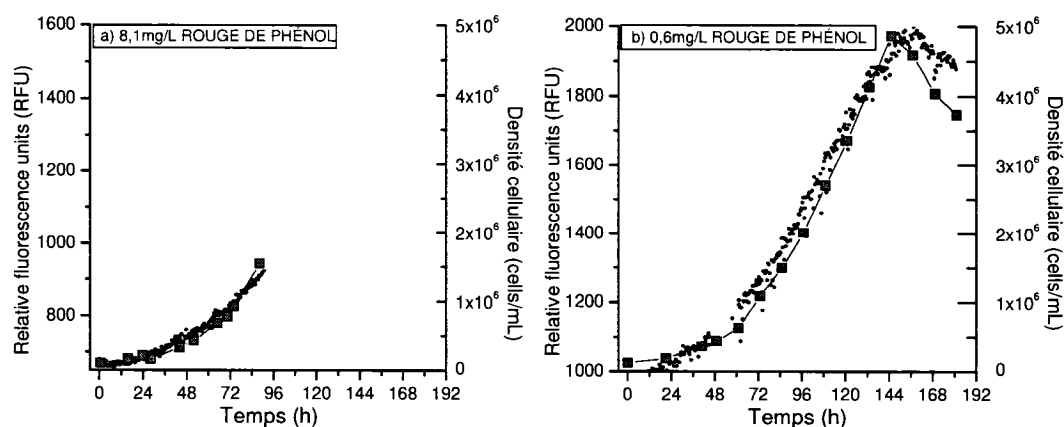
## **5.2. Résultats et discussion**

Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur cinq cultures en réacteur : deux cultures préliminaires, puis les trois cultures utilisées pour l'étude du métabolisme énergétique (CTRL, NaBu-48h, NaBu-74h). Le maintien de la concentration en oxygène dissous à un point de consigne, requis pour corrélérer la concentration cellulaire avec l'évolution du signal de NAD(P)H, a été assuré pour chaque culture tel que détaillé dans la section Méthodologie de ce mémoire.

### **5.2.1. Mesure de fluorescence sur des milieux avec et sans rouge de phénol**

Outil de détection d'une contamination, le rouge de phénol est couramment utilisé dans la formulation de milieux de culture pour cellules mammifères dû à sa sensibilité au pH de l'environnement. De couleur rouge à des pH basiques et jaune à des pH acides, il permet d'observer concrètement l'acidification graduelle de l'environnement extracellulaire causée par l'accumulation de CO<sub>2</sub> et d'acide lactique et agissant avec le tampon bicarbonate. Alors que la couleur d'une culture normale varie de rouge à jaune-orangé sur plusieurs jours, une contamination bactérienne acidifie le milieu rapidement et lui donne une teinte jaune vif.

Le milieu de culture Biogro-CHO (Special CellNet formulation) vient de base avec une concentration en rouge de phénol de 0,6mg/L, alors qu'il est suggéré d'employer une concentration de 8,1mg/L pour une surveillance efficace de la contamination bactérienne. Or, le rouge de phénol affecte les mesures de fluorescence en masquant le signal du NADH (Siano et Mutharasan 1991). Des cultures avec des concentrations différentes en rouge de phénol ont donc été effectuées. Les deux premières cultures réalisées avec des milieux contenant 8,1mg/L et 0,6mg/L rouge de phénol (Figure 5.1) démontrent l'interférence du rouge de phénol sur les mesures de fluorescence.



**Figure 5.1** Mesure de fluorescence du NAD(P)H (ex 350/em 450) pour une culture en bioréacteur avec un milieu contenant a) 8,1mg/L de rouge de phénol et b) 0,6mg de rouge de phénol. Densité cellulaire ( $\square$ ); Signaux de fluorescence ( $\circ$ )

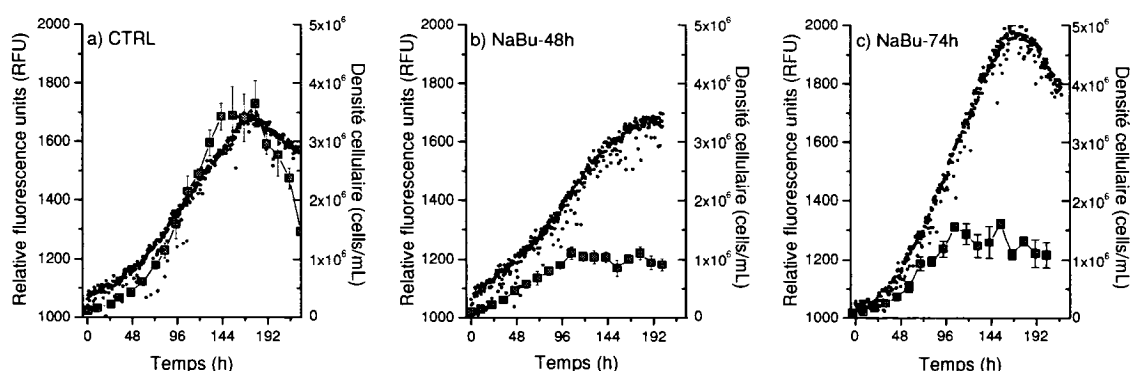
Des mesures d'unité relative de fluorescence plus basses ont été obtenues pour la culture avec une concentration plus importante en rouge de phénol ( $\text{RFU} < 700$ ), malgré des croissances cellulaires similaires. Les données de la culture avec une basse concentration en rouge de phénol ont été traitées et employées pour démontrer la validité

de la sonde à suivre la croissance des cellules CHO (résultats en voie d'être soumis pour publication).

Les autres cultures (CTRL, NaBu-48h et NaBu-74h) ont été effectuées en utilisant du milieu contenant 0,6mg/L rouge de phénol.

### 5.2.2. Signaux de fluorescence du NADPH des cultures CTRL, NaBu-48h et NaBu-74h

La sonde à fluorescence a été employée pour suivre les cultures sans (Figure 5.2a) ou avec (Figure 5.2b et c) ajout de butyrate de sodium.



**Figure 5.2 Mesure de fluorescence du NAD(P)H (ex 350/em 450) pour la culture en bioréacteur a) CTRL b) NaBu-48h et c) NaBu-74h. Densité cellulaire (□); Signaux de fluorescence (•)**

Le signal de fluorescence de la culture contrôle (CTRL) a suivi la tendance de la croissance obtenue par compte cellulaire. Malgré des zones de surestimation/sous-estimation de la croissance cellulaire, le signal a permis un suivi significatif de l'évolution de la culture. Au contraire, pour les cultures NaBu-48h et NaBu-74h, de fortes divergences entre les données de fluorescence et de densité cellulaire ont été observées. Alors que l'ajout de butyrate de sodium a causé l'arrêt de la croissance et

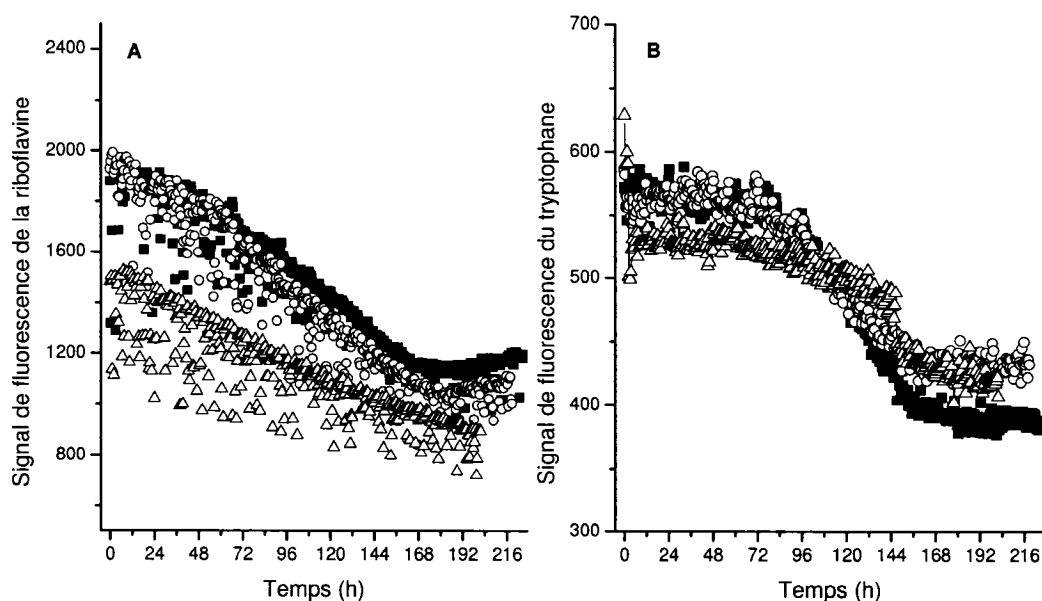
l'entrée dans la phase plateau, le signal de NAD(P)H a continué d'augmenter au fil des cultures augmentant progressivement l'écart entre les deux mesures.

L'augmentation du signal de NADH pour les cultures avec ajout de butyrate de sodium peut refléter un changement de l'état énergétique des cellules. Tout comme des ajouts pulsés en glucose ou en glutamine modifient le signal de NAD(P)H des cellules hybridomes (Siano et Mutharasan 1991), le signal de fluorescence peut indiquer une variation d'activité du cycle TCA et de la production de NADH mitochondrial. Afin d'évaluer l'augmentation de la concentration cellulaire en NAD(P)H libre dans la cellule pouvant résulter de l'arrêt de la synthèse d'ADN, les données de fluorescence spécifique ont été calculées. Ces données de fluorescence reportées par million de cellules sont présentées et discutées dans le manuscrit de l'article au chapitre 4.

Bien qu'il soit impossible de différencier les signaux du NADH de ceux du NADPH, les fonctions anaboliques associées aux changements en NADPH ne se répercutent pas en des changements significatifs au degré de fluorescence du signal NAD(P)H. Ainsi, les variations sont plus particulièrement associées au signal du NADH (Siano et Mutharasan 1991).

### 5.2.3. Signaux de fluorescence du tryptophane et de la riboflavine des cultures CTRL, NaBu-48h et NaBu-74h

La sonde à fluorescence a également permis de suivre les signaux de fluorescence de l'acide aminé (ou dérivé) tryptophane/tryptamine et de la vitamine riboflavine (Figure 5.3).



**Figure 5.3** Mesure de fluorescence (A) de la riboflavine (excitation 450nm/émission 530nm) et (B) du tryptophane/tryptamine (excitation 270nm/émission 370nm) pour les cultures en bioréacteur. CTRL (■), NaBu-48h (Δ) et NaBu-74h (○)

On remarque une diminution des signaux durant les cultures suivant la consommation de ces composés par les cellules.



### 5.3. Conclusion

L'excitation et l'émission de plusieurs longueurs d'ondes permettent le suivi de composés variés, notamment de l'acide aminé (ou dérivé) tryptophane/tryptamine (excitation 270nm/émission 370nm), de la vitamine riboflavine (excitation 450nm/émission 530nm) de même que des métabolites énergétiques NAD(P)H (excitation 350nm/émission 450nm).

Les données de cultures effectuées avec un milieu contenant 0,6mg/L ou 8,1mg/L de rouge de phénol ont montré l'influence de ce dernier sur les signaux de fluorescence du NAD(P)H. Pour éclaircir le signal, les cultures en réacteur ont donc été réalisées avec un milieu appauvri en rouge de phénol. L'acquisition du signal de fluorescence du NAD(P)H a permis un suivi significatif de l'évolution de la densité cellulaire, évaluée par compte sur hémocytomètre, pour les cultures en mode cuvée. Ces données permettent d'envisager l'emploi d'une sonde à fluorescence pour le suivi en ligne de la croissance cellulaire de cultures CHO non perturbées. Toutefois, des écarts marqués entre le signal de NAD(P)H et la croissance ont été notés pour les cultures perturbées par ajout de butyrate de sodium peut-être en raison de changements physiologiques des cellules. Les données de fluorescence semblent toutefois fournir des informations importantes sur le métabolisme énergétique cellulaire des cultures avec ajout de butyrate de sodium, les hausses des concentrations spécifiques en NAD(P)H pouvant être jumelées à un accroissement de l'état énergétique.

Des mesures par chromatographie HPLC-MS des concentrations en NAD(P)H d'extraits cellulaires permettraient de confirmer les résultats obtenus par les mesures de fluorescence. Cependant, les méthodes d'extraction avec des acides forts dégradent les formes réduites des NADH et NADPH. En substitution de l'extraction à l'acide perchlorique utilisée dans ce projet, une méthode d'extraction à l'acétonitrile permettrait de préserver ces composés.

## CHAPITRE 6 : INACTIVATION DU T-PA

### 6.1. Introduction

L'activateur du plasminogène humain possède, dans le plasma *in vivo*, un court temps de demi-vie (de l'ordre de 2 à 5 minutes) (Kluft 1988). Son activité est régulée par la clairance du flux sanguin ainsi que par l'altération de l'activité enzymatique par des inhibiteurs ou enzymes protéolytiques (kalikréine, plasmine, trypsine) dans la circulation (Kluft 1988; Kadouri et Bohak 1985; Lin, Kimura, et Miller 1993; Lin, Kimura, et Miller 1993). *In vitro*, la lignée cellulaire et les conditions et système de culture influent sa qualité et son temps de demi-vie. Clivage, agrégation, adsorption de surface, erreurs de glycosylation et de repliement, l'inactivation d'une protéine peut résulter de diverses altérations, suivant ou précédant sa sécrétion. Dans le cadre de ce projet, une inactivation du t-PA produit en réacteur a été observée en fin de culture et des essais ont été faits pour tenter d'en identifier l'origine.

### 6.2. Choix des essais

Le tableau suivant présente les caractéristiques propres au mode de cultures statiques, en spinner ou en bioréacteur.

**Tableau 6.1** Caractéristiques des cultures statiques (T-flasks ou plaque multi-puits), en spinner ou en bioréacteur

Paramètres	Caractéristiques		
	Culture statique	Spinner	Bioréacteur
<b>Volume</b>	5mL, 25mL ou 60mL	250mL	2,7L
<b>Température</b>	37°C (incubateur)	37°C (incubateur)	37°C (chemise chauffante)
<b>pH</b>	7,4 à 6,6 (non contrôlé)	(non contrôlé)	7,4 à 7,0
<b>%CO<sub>2</sub></b>	10%	10%	0-10% (selon le pH)
<b>%O<sub>2</sub> dissous</b>	-	-	>50% de la saturation en air
<b>Agitation</b>	Non agité	60RPM (turbine Rushton)	60RPM (double ruban hélicoïdal)
<b>Croissance cellulaire</b>	Similaire	Similaire	Similaire
<b>Inactivation du t-PA</b>	Aucune	Aucune	En fin de culture
<b>Matériau des surfaces</b>	Polystyrène	Verre (siliconé)	Acier inoxydable
<b>Numéro de passage</b>	> 4	> 4	7

À partir de ces données, les essais ont été coordonnés pour étudier l'activité protéolytique, la production en système statique versus en bioréacteur, l'agitation, l'adsorption de surface et l'oxygène dissous. Les résultats obtenus des divers tests et leurs interprétations sont présentés dans les sections suivantes.

### 6.3. Activité protéolytique

Les protéases et sialidases, présentes dans les milieux avec sérum ou bien produites de la lyse ou sécrétion cellulaire, sont reconnues pour altérer la qualité des glycoprotéines. Un clivage protéolytique du t-PA ou d'autres protéines recombinantes *in vitro* a été suggéré dans de nombreux travaux (Hendrick, Winnepenninckx, Adelkafi, Vandeputte, Cherlet, Marique et al. 2001; Yoon, Choi, Song, et Lee 2005; Lin, Kimura, et Miller 1993). Des inhibiteurs peuvent toutefois être ajoutés au milieu de culture pour empêcher la dégradation du t-PA.

#### 6.3.1. Démarche expérimentale

Des échantillons d'une culture en T-flask ont été prélevés et centrifugés quotidiennement. Les surnageants (sans cellule) ont été transférés dans des eppendorfs stériles et conservés à l'incubateur à 37°C, 10%CO<sub>2</sub>, 100%HR de 1 à 3 jours. Des échantillons de surnageants de la culture-mère (0 jour additionnel d'incubation) et des eppendorfs conservés à l'incubateur de 1 à 3 jours ont été stockés dans l'azote liquide en attente des mesures de t-PA actif.

Des échantillons d'une culture en bioréacteur ont été prélevés et centrifugés quotidiennement. Les surnageants (sans cellule), auxquels de la pénicilline/streptomycine avait été ajoutée, ont été transférés dans des eppendorfs stériles et conservés à l'incubateur à 37°C, 10%CO<sub>2</sub>, 100%HR de 1 à 7 jours. Des échantillons de surnageants de la culture-mère (0 jour additionnel d'incubation) et des

eppendorfs conservés à l'incubateur de 1 à 7 jours ont été stockés dans l'azote liquide en attente des mesures de t-PA actif.

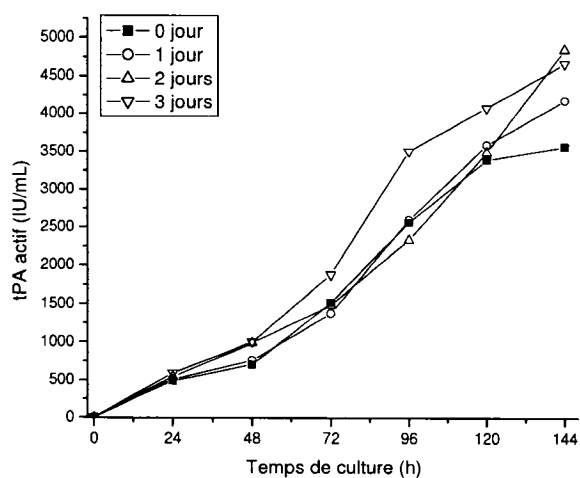
### 6.3.2. Objectif

- Vérifier s'il y a accentuation de l'inactivation du t-PA suite à l'incubation à 37°C de surnageants usés sans cellule, démontrant l'action de protéases

### 6.3.3. Résultats et discussion

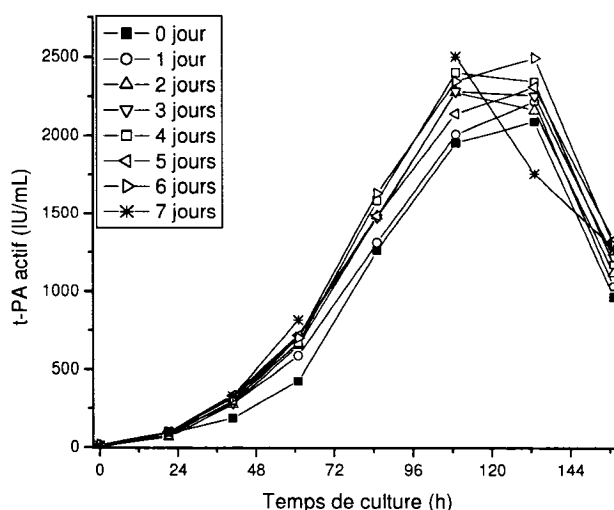
Des pH inférieurs à 7 (Kratje, Lind, et Wagner 1994) et une température de 37°C (en comparaison à de basses températures) favorisant l'activité des protéases relâchées dans le milieu de culture (Clark, Chaplin, et Harcum 2004; Gramer et Gooche 1993), l'incubation de surnageant sans cellule permettrait d'observer l'action protéolytique, si action il y a. Ainsi, l'activité protéolytique a été examinée par incubation de surnageants usés (sans cellule) provenant de culture en T-flask (Figure 6.1) et bioréacteur (Figure 6.2).

La Figure 6.1 montre les activités du t-PA mesurées dans les surnageants prélevés des T-flasks chaque jour (0 jour d'incubation additionnel) et ceux entreposés de 1 à 3 jours additionnels à 37°C. L'incubation de surnageants sur plusieurs jours additionnels n'a pas causé de dégradation du t-PA ce qui démontre qu'aucune protéase n'agit lors des cultures statiques.



**Figure 6.1** Suivi de l'activité du t-PA contenu dans le surnageant de cultures en T-flasks de 75 cm<sup>2</sup> (Moyenne de t-PA actif de deux cultures simultanées). Les surnageants sans cellule ont été conservés dans l'incubateur 0 jour, 1 jour, 2 jours et 3 jours additionnels. Réalisé avec l'aide de C.Durand.

D'un autre côté, l'incubation à 37°C de 1 à 7 jours additionnels d'échantillons de surnageants montrant une inactivation du t-PA après 108 heures de culture en bioréacteur n'a révélé aucune accentuation de la dégradation (Figure 6.2). Ces résultats démontrent l'absence d'activité protéolytique dans le surnageant des cultures en bioréacteur.



**Figure 6.2** Suivi de l'activité du t-PA contenu dans le surnageant d'une culture en bioréacteur. Les surnageants sans cellule ont été conservés dans l'incubateur 0 jour, 1 jour, 2 jours, 3 jours, 4 jours, 5 jours, 6 jours et 7 jours. Réalisé avec l'aide de C.Durand.

En absence de baisse de concentration en t-PA actif lors d'incubation de surnageants usés à 37°C, ces essais infirment l'action protéolytique, tant pour les cultures en réacteur qu'en T-flasks. Ils ont toutefois mis en évidence l'écart de production pour les suspensions en T-flasks et en réacteur (et ce, malgré des comptes cellulaires similaires).

#### 6.4. Production en T-flasks versus en bioréacteur

La littérature suggère des variations du patron de glycosylation selon le réacteur employé, variations pouvant affecter l'activité protéique (Schweikart, Jones, Jaton, et Hughesm 1999).

##### 6.4.1. Démarche expérimentale

Des échantillons stériles de la culture en bioréacteur NaBu-48h ont été prélevés quotidiennement entre 72 et 144 heures et ont été transférées dans des T-flasks incubées



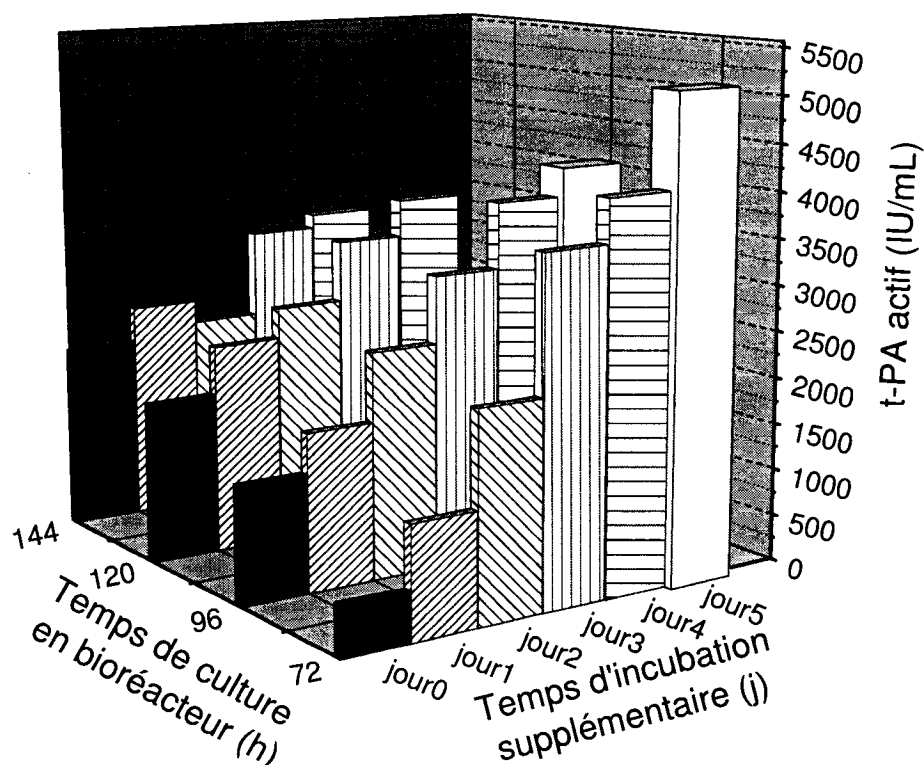
à 37°C, 10%CO<sub>2</sub>, 100%HR. Des échantillons de surnageant de la culture-mère en bioréacteur et des cultures en T-flasks ont été stockés dans l'azote liquide en attente des mesures de t-PA actif.

#### 6.4.2. Objectif

- Vérifier si la production en T-flasks est similaire à celle en bioréacteur pour une même suspension cellulaire

#### 6.4.3. Résultats et discussion

La Figure 6.3 montre les niveaux en t-PA actif des échantillons du bioréacteur (prélevés à partir de la 72<sup>ième</sup> heure de culture) et des échantillons des cultures statiques en T-flasks.



**Figure 6.3** Différence de production en t-PA pour des cellules en bioréacteur et en T-flasks. Les suspensions prélevées de la culture en bioréacteur après 72h, 96h, 120h ou 144h ont été conservées en T-flasks dans l'incubateur 0 jour, 1 jour, 2 jours, 3 jours, 4 jours et 5 jours. Réalisé avec l'aide de C.Durand.

Sur cette figure, les barres noires représentent le t-PA mesuré pour la culture-mère en bioréacteur. En comparant les niveaux en t-PA produit par les cellules de mêmes âges, on remarque un accroissement de la production pour les cellules mises en T-flasks. Les suspensions de 6 jours ont par exemple été prélevées du réacteur à 144h (t-PA extracellulaire = 1979 IU/mL), ou encore à 72h et incubées trois journées en flasks (t-PA extracellulaire = 3665IU/mL). De plus, aucune inactivation du t-PA n'a été observée en T-flasks, une inactivation étant pourtant visible en réacteur après 167h (se référer à la figure 4.2). À noter également que les cellules provenant de la suspension agitée ont

fortement adhérees aux parois de T-flasks après moins de 24 heures ce qui a empêché les comptes cellulaires (l'emploi de trypsine aurait affecté la qualité du t-PA) ce qui témoigne d'un stress.

## **6.5. Agitation**

La configuration des systèmes de culture peut altérer la production de protéines recombinantes par leur géométrie, les matériaux employés ou le cisaillement généré (Senger et Karim 2003; Keane, Ryan, et Gray 2003).

### **6.5.1. Démarche expérimentale**

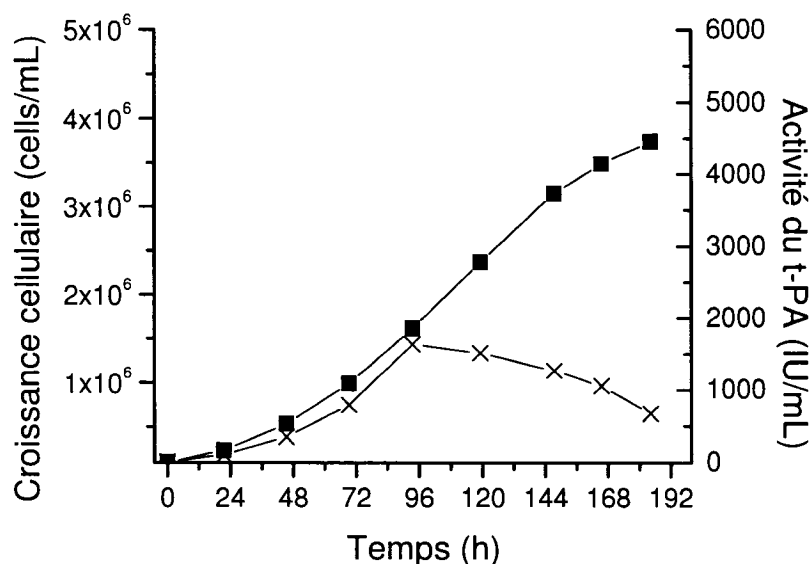
Une culture a été réalisée sur 8 jours dans un spinner de 250mL (Bellco) agité à 60RPM et maintenu dans un incubateur à 37°C, 10%CO<sub>2</sub>, 100%HR. Des échantillons ont été prélevés quotidiennement. Les surnageants ont été stockés dans l'azote liquide en attente des mesures de t-PA actif.

### **6.5.2. Objectif**

- Comparer l'effet de deux agitateurs différents (culture en spinner vs en bioréacteur)

### **6.5.3. Résultats et discussion**

L'agitation pourrait favoriser l'agrégation des molécules de t-PA en les rendant du même coup inactives. Afin d'observer l'effet d'une agitation différente à celle des cultures en bioréacteur, une culture en spinner a été effectuée. La Figure 6.4 montre la croissance cellulaire et la production de t-PA pour la culture en spinner.



**Figure 6.4** Croissance cellulaire et production de t-PA actif en spinner 250mL (agitation =60RPM). Symboles : Activité du t-PA (■) et croissance cellulaire (x). Réalisé avec l'aide de C.Durand.

Aucune inactivation du t-PA n'a été observée lors de cette culture. Les cellules prélevées lors de la culture en spinner et mises en flasks deviennent par contre, tout comme pour une suspension prélevée en bioréacteur, fortement adhérentes. Malgré tout, ces essais n'ont pas permis de confirmer l'influence de l'agitation sur l'inactivation du t-PA produit en réacteur. Des taux de cisaillement possiblement inférieurs pourraient expliquer l'absence d'inactivation en spinner.

## 6.6. Adsorption de surface

Il a été montré que des couches multiples de protéines peuvent s'adsorber sur le métal (Zhang, Kang, Neoh, Wang, et Tan 2001) et le verre (Doran 2006) par de fortes attractions électrostatiques. Ces interactions protéines-surface peuvent induire des

changements de conformation de protéines entraînant leur dénaturation et inactivation. D'ailleurs, l'adsorption de surface a été identifiée comme la cause d'une perte en concentration d'anticorps pour des cellules de plantes cultivées dans des flacons de verre, en absence de biomasse et de protéases (Doran 2006).

#### 6.6.1. Démarche expérimentale

Parallèlement aux essais d'agitation, un échantillon de la culture en spinner a été prélevé au 4<sup>ième</sup> jour. La suspension a été centrifugée et du surnageant stérile a été transféré dans cinq vials en nalgène contenant chacun un disque stérile en acier inoxydable passivé. Les vials ont alors été incubés de 0 à 144 heures respectivement à 37°C, 10%CO<sub>2</sub>, 100%HR. Le contenu d'un vial a été stocké quotidiennement dans l'azote liquide en attente des mesures de t-PA actif.

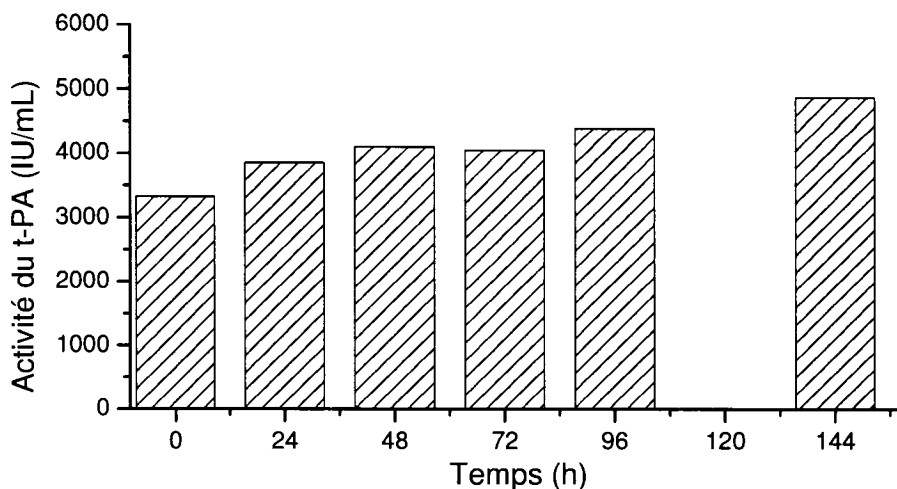
#### 6.6.2. Objectif

- Vérifier s'il y a une baisse de la concentration en t-PA actif dans les surnageants suite à l'incubation avec des pièces métalliques.

#### 6.6.3. Résultats et discussion

L'activité du t-PA contenu dans des surnageants mis en contact de 0 à 144 heures avec un disque métallique est présentée à la Figure 6.5. L'absence de baisse marquée sur les mesures en t-PA en fonction des temps de contact suggèrent qu'il n'y ait pas adsorption du t-PA sur l'acier inoxydable. Ainsi, le t-PA ne se lierait pas avec la paroi de la cuve

du bioréacteur. Les faibles variations dans les mesures sont probablement dues aux erreurs inhérentes à la méthode d'analyse.



**Figure 6.5** Mesure du t-PA actif contenu dans du surnageant mis en contact avec des disques d'acier inoxydable 0 , 24, 48, 72, 96 ou 144 heures. Réalisé avec l'aide de C.Durand.

### 6.7. Oxygène dissous

La sonde à oxygène réagissant avec l'humidité de l'incubateur, les essais n'ont pu être complétés. D'après la littérature, des stress oxydatifs résultant de forte concentration en oxygène dissous dans le milieu peuvent induire un mauvais repliement protéique (Xue, Piao, Nakajima, Sakon-Komazawa, Kojima, Mori et al. 2005; Dunster, Cheeseman, et Maddix 1997), des changements de glycosylation (Kunkel, Jan, Jamieson, et Butler 1998), des dommages à l'ADN et aux membranes et ultimement l'apoptose par la formation de composés réactifs ROS (Reactive Oxygen Species), tels les ions hydroxyls (Emery, Jan, et Al-Rueai 1995). Ces effets sont généralement observés à des

concentrations supérieures à 100% de la saturation en air, concentration jamais atteinte en T-flasks et en réacteur. Par contre, de faibles taux en oxygène dissous (inférieurs à 10% de la saturation en air) ont quant à eux été corrélés à des baisses de productivité spécifique dans certains cas (Restelli, Wang, Éthier, Perreault, et Butler 2006; Lin, Kimura, et Miller 1993; Link, Bäckström, Graham, Essers, Zörner, Gätgens et al. 2004) et dans d'autres cas, à des hausses (Phillips, Scharer, Bols, et Moo-Young 1987). Des études ont toutefois montré peu de changements dans la N-glycosylation du t-PA produit par des CHO sous des conditions normales, moyennement hypoxiques, sévèrement hypoxiques et anoxiques (Lin, Kimura, et Miller 1993). Une productivité similaire est généralement observée pour des concentrations médianes en oxygène dissous (Restelli, Wang, Éthier, Perreault, et Butler 2006; Dunster, Cheeseman, et Maddix 1997), des concentrations typiques entre 20-50% de la saturation en air permettant de maintenir une croissance optimale. Or, alors que la concentration en oxygène dissous est maintenue à des niveaux supérieurs au point de consigne en réacteur, il n'a pas été possible d'obtenir de données sur la teneur en oxygène dissous dans les cultures en incubateur.

## **6.8. Conclusion**

Ces essais réalisés afin d'étudier l'influence des protéases, de l'agitation et de l'adsorption de surface n'ont pas permis d'identifier une cause exacte de l'inactivation du t-PA observée en bioréacteur. Toutefois, ils ont mis de l'avant des différences marquées entre la production en T-flasks et en bioréacteur. Des essais supplémentaires devront être effectués, notamment pour l'agitation et l'oxygène dissous.

## CHAPITRE 7 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Avec l'accroissement du marché des produits protéiques et le raffinement des techniques de génie génétique et moléculaire, les cultures de cellules recombinantes pour la production de composés à valeur thérapeutique se sont développées. En raison de leur machinerie complexe semblable à celle des cellules humaines, les cellules animales sont devenues des plates-formes de choix. Par contre, les faibles concentrations en produit sécrété dans le milieu de culture mettent un frein à la pleine expansion de cette industrie.

L'optimisation de la productivité peut s'effectuer en empruntant typiquement deux voies, l'une visant l'accroissement de la densité cellulaire maximale atteinte et l'autre, de la productivité spécifique. De nombreuses études ont ainsi porté sur l'amélioration des milieux de culture pour fournir les nutriments essentiels tout en limitant les rejets toxiques. Des avancées majeures ont été réalisées au cours des dernières années, mais une hausse des rendements est encore requise pour assurer la rentabilité des procédés industriels et l'accessibilité des médicaments aux patients. Or, tant la croissance que la production cellulaire sont des processus énergivores : une part importante d'énergie libre emmagasinée notamment dans les liens phosphoanhydrides de l'ATP est requise pour la biosynthèse de constituants cellulaires. Les nucléotides étant impliqués dans de nombreuses étapes du complexe réseau métabolique cellulaire, leur suivi pourrait ainsi permettre d'identifier un état physiologique permettant une productivité maximale ou encore de cerner les modifications génétiques nécessaires par court-circuitage ou stimulation d'une ou de plusieurs voies afin de canaliser les sources énergétiques vers la



synthèse de produit. De plus, le suivi de leurs variations pourrait servir à décrire l'état réel d'une culture.

Afin d'établir l'influence des nucléotides dans les procédés cellulaires, le métabolisme doit être perturbé. Ceci permet d'observer les réponses à des stimuli et d'activer les systèmes de contrôle. Les travaux réalisés au cours de ce projet ont ainsi permis d'observer une hausse d'énergie disponible suite à l'ajout de butyrate de sodium. Par l'inhibition de la synthèse de l'ADN, ce composé inhibe la croissance cellulaire, mais stimule la productivité. L'emploi de butyrate de sodium a entraîné des augmentations en concentrations intracellulaire de métabolites énergétiques libres majeurs, tels l'ATP, ce qui suggère l'atteinte d'un environnement métabolique pouvant favoriser la synthèse cellulaire. Toutefois, des chercheurs ont proposé qu'une hausse des concentrations en ATP intracellulaire suite à l'inhibition de la synthèse d'ADN soit potentiellement causée par une augmentation de la taille des cellules plutôt que par l'arrêt de la synthèse cellulaire (Modha, Whiteside et Spier 1992).

Des combinaisons de nucléotides sous forme de ratio ont alors été calculées pour éliminer les incertitudes quant aux tailles cellulaires. Ainsi, malgré les variations possibles à la taille des cellules durant les cycles cellulaires et en situation de stress, les changements en ratio UTP/ATP, l'accroissement des  $qO_2$  et les hausses en signaux de fluorescence du NAD(P)H après les ajouts de butyrate de sodium ont montré une stimulation réelle du métabolisme cellulaire. Ces résultats démontrent l'intérêt d'étudier

le métabolisme afin d'obtenir des informations importantes sur le fonctionnement cellulaire dans le but d'accroître les potentiels de production.

D'autre part, le suivi des signaux de NAD(P)H avait également pour objectif de montrer la possibilité d'employer une sonde à fluorescence à longueurs d'ondes multiples pour estimer en ligne la croissance cellulaire. L'emploi de la sonde pour l'acquisition des données de croissance des cellules CHO s'est révélé être une méthode non invasive efficace pour la culture contrôle (sans ajout de butyrate de sodium). Les signaux de fluorescence du NAD(P)H obtenus ont corrélé de façon significative les données de compte cellulaire. Par contre, la hausse des signaux de NAD(P)H suite à l'introduction de la perturbation par l'ajout de butyrate de sodium a causé une surévaluation de la croissance cellulaire. Dans le cas de culture soumis à un stimulus, la sonde à fluorescence ne pourrait donc servir d'outil d'estimation en ligne de la croissance cellulaire, mais serait tout de même un précieux indicateur de l'état énergétique de la culture.

En ce qui à trait à la productivité de t-PA, la phase d'inactivation du t-PA observée en bioréacteur a causé une sous-estimation des augmentations en productivité cellulaires et n'a pas permis d'apprécier la stimulation réelle générée par l'ajout de butyrate de sodium. Les hypothèses d'action protéolytique ou d'adsorption de surface ont été rejetées, mais d'autres essais devraient être faits pour étudier l'effet de l'agitation ou de l'oxygène dissous sur l'activité de la protéine modèle. D'autre part, la méthode de

quantification du t-PA était basée sur une mesure d'activité, cette dernière dépendant de la structure de la protéine. Il serait alors pertinent de déterminer si les pertes d'activité du t-PA résultent d'une altération à la structure de la protéine dans la période pré ou post sécrétion.

Pour terminer, l'emploi du butyrate de sodium dans des cultures à grande échelle pourrait permettre de contourner les difficultés à obtenir des transferts d'oxygène efficaces dans les cuves de grandes dimensions. En diminuant les besoins en oxygène par une densité cellulaire finale plus basse et en combinant une productivité élevée, l'ajout de butyrate de sodium présente des caractéristiques intéressantes.

## CHAPITRE 8 : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce projet de maîtrise avait pour objectif l'étude du métabolisme énergétique des cellules CHO en relation avec la productivité cellulaire. Du butyrate de sodium a été utilisé à titre d'agent stimulateur puisqu'il est reconnu pour accroître la production des cellules recombinantes.

Le suivi des nucléotides pour les cultures avec ajout de butyrate de sodium a montré un accroissement de la concentration intracellulaire en nucléotides essentiels tels ATP, GTP, UTP, CTP comparativement au niveau mesuré pour une culture contrôle, sans ajout de butyrate de sodium. Afin d'enlever les biais pouvant être causés par une modification de la taille des cellules au cours des cultures, des ratios énergétiques ont été calculés. Les variations en ratio UTP/ATP, les hausses en signaux de fluorescence du NAD(P)H et l'accroissement des  $qO_2$  après les ajouts de butyrate de sodium permettent de conclure en une stimulation réelle du métabolisme cellulaire. Afin de continuer l'étude du métabolisme énergétique des cellules CHO, des ajouts pulsés en glucose ou glutamine pour des cultures limitées en un de ces nutriments essentiels permettraient d'obtenir des données supplémentaires significatives.

Les cellules mammifères CHO ayant été introduites dans le laboratoire par l'amorce de cette maîtrise, des améliorations aux méthodes de cultures et de suivi des métabolites énergétiques peuvent être suggérées pour les expériences futures et la suite des essais d'inactivation. En ce qui a trait à l'amélioration des conditions de cultures, un meilleur

contrôle de pH et de la concentration en oxygène dissous pourrait être réalisé. L'ajout d'une alimentation en azote au système permettrait de fixer le point de consigne en oxygène dissous à la valeur souhaitée dès le début de la culture. Le système actuel maintenait la concentration en oxygène dissous au point de consigne (fixé à 50%) par une alimentation en oxygène (l'oxygène dissous diminuait donc de 90% en début de culture à 50%, pour ensuite être maintenu à 50%). Aussi, de plus faibles variations en pH pourraient être obtenues en combinant au contrôle par ajustement du débit de  $\text{CO}_2$ , une pompe doseuse de bicarbonate ou de NaOH.

D'autre part, une méthode d'extraction à l'acétonitrile en substitution à celle à l'acide perchlorique éviterait la dégradation de plusieurs composés importants notamment NAD(P)H et CMP. L'extraction d'un plus grand nombre de cellules pour chaque échantillon permettrait de surcroît d'augmenter la précision des analyses obtenues par HPLC-MS. Toutefois, pour demeurer dans la zone de linéarité des mesures, des échantillons dilués devraient également être préparés pour quantifier l'ATP, le composé le plus concentré dans les échantillons. Ainsi, il en résulterait un temps d'analyse doublé. Finalement, pour assurer l'exactitude des résultats, des mesures comparatives d'ATP et ADP pourraient être réalisées en employant les techniques de « luciférase assay » en plus de celles par HPLC-MS

En dernier lieu, l'étude de l'inactivation du t-PA observée en bioréacteur devrait se concentrer à approfondir l'effet de l'agitation (cisaillement) et de l'oxygène dissous.

Pour ce faire, des cultures en bioréacteur avec une configuration autre ou avec de faibles valeurs consigne en oxygène dissous pourraient être effectuées. De plus, des méthodes de mesures du t-PA plus précises, par ELISA notamment, permettrait d'accroître la fiabilité des mesures. Il est à noter par exemple que le test de mesure de t-PA donne des valeurs d'activité accrue pour les molécules double chaîne versus simple chaîne.

## RÉFÉRENCES

- ALTAMIRO, C., PAREDES, C., ILLANES, A., CAIRÓ, J.J., GÑDIA, F. 2004. "Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium". *Journal of biotechnology*. 110:171-179.
- ATKINSON, D.E. 1977. *Cellular energy metabolism and its regulation*. USA : Academic Press, Inc.
- AU, J.L., SU, M.H., WIENTJES, M.G. 1989. "Extraction of intracellular nucleosides and nucleotides with acetonitrile". *Clinical chemistry*. 35 : 1. 48-51.
- BACHINGER, T., MANDENIUS, C.-F. 2000. "Searching for process information in the aroma of cell culture". *Trends in biotechnology*. 18:494-500.
- BARNABÉ, N., BUTLER, M. 2000. "The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma". *Cytotechnology*. 34:47-57.
- BARNABÉ, N., BUTLER, M. 1994. "Effect of temperature on nucleotide pools and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma". *Biotechnology and bioengineering*. 44:1235-1245.

- BARNABÉ, N., BUTLER, M. 1998. "The relationship between intracellular UDP-N-acetylhexosamine nucleotide pool and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma ". *Journal of biotechnology*. 60:67-80.
- BARRY, J.A., MCGOVERN, K.A., LIEN, Y.-H.H., ASHMORE, B., GILLIES, R.J. 1993. "Dimethyl methylphosphate (DMMP): a  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopic probe of intracellular volume in mammalian cell cultures". *Biochemistry*. 32:4665-4670.
- BOFFA, L.C., VIDALI, G., MANN, R.S., ALLFREY, V.G. 1978. "Suppression of histone deacetylation *in vivo* and *in vitro* by sodium butyrate". *The Journal of biological chemistry*. 253:3364-3366.
- BORDONARO, M., MARIADASON, J.M., ASLAM, F., HEERDT, B.G., AUGENLICHT, L.H. 1999. "Butyrate-induced apoptic cascade in colonic carcinoma cells: modulation of the  $\beta$ -Catenin-Tcf pathway and concordance with effects of sulindac and trichostation A but non curcumin". *Cell growth & differentiation*. 10:713-720.
- BRANDT, J.T. 2002. "Plasminogen and Tissue-Type Plasminogen Activator Deficiency as Risk Factors for Thromboembolic Disease". *Archives of pathology & laboratory medicine*. 126:1376-1381.
- BRIDGER, W.A., HENDERSON, J.F. 1983. *Cell ATP*. USA : John Wiley & Sons.



CAMBRIDGE STUDIES IN BIOTECHNOLOGY 1994. "Animal cells as bioreactors".

*Adjusting cellular metabolism for optimum product yield.* Sous la direction de T. CARTWRIGHT. Cambridge, UK : Cambridge University Press. P. 96-111.

CANDIDO, E.P.M., REEVES, R., DAVIE, J.R. 1978. "Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells". *Cell*. 14:105-113.

CHERLET, M., MARC, A. 2000. "Stimulation of monoclonal antibody production of hybridoma cells by butyrate: evaluation of a feeding strategy and characterization of cell behaviour". *Cytotechnology*. 32:17-29.

CHOU, I.-N.Z.J., RAPAPORT, E. 1984. "Imbalance of total cellular nucleotide pools and mechanism of the colchicine-induced cell activation". *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 81:2401-2405.

CHU, L., ROBINSON, D.K. 2001. "Industrial choices for protein production by large-scale cell culture". *Current opinion in biotechnology*. 12:180-187.

CLARK, K.J.R., CHAPLIN, F.W.R., HARCUM, S.W. 2004. "Temperature effects on product-quality-related enzymes in batch CHO cell cultures producing recombinant tPA". *Biotechnology progress* . 20:6. 1888-1892.

- COHEN, J.S., MOTIEL, M., CARMI, S., SHIPERTO, D., YEFET, O., RINGEL, I. 2004. "Determination of intracellular pH and compartmentation using diffusion-weighted NMR spectroscopy with pH-sensitive indicators". *Magnetic resonance in medicine*. 51: 900-903.
- COUSENS, L.S., GALLWITZ, D., ALBERTS, B.M. 1979. "Different accessibilities in chromatin to histone acetylase". *The Journal of biological chemistry*. 254:1716-1723.
- CRUZ, H.J., FREITAS, C.M., ALVES, P.M., MOREIRA, J.L., CARRONDO, M.J.T. 2000. "Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells". *Enzyme and microbial technology*. 27:1. 43-52.
- DATAR, R.V., CARTHWRIGHT, T., ROSEN, C.-G. 1993. "Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator". *Bio/technology*. 11:349-357.
- DAVIE, J.R. 2003. "Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate". *The Journal of nutrition*. 133:2485S-2493S.
- DAVIS, P.K., JOHNSON, G.V.W. 1999. "Energy metabolism and protein phosphorylation during apoptosis a phosphorylation study of tau and high-molecular-weight tau in differentiated PC12 cells ". *The biochemical journal*. 340:51-58.

- DE KORTE, D., HAVERKORT, W.A., DE BOER, M., VAN GENNIP, A.H., ROOS, D. 1987. "Imbalance in the nucleotides pools of myeloid leukemia cells and HL-60 cells: correlation with cell-cycle phase, proliferation, differentiation, and transformation". *Cancer research*. 47:1841-147.
- DESHPANDE, R.R., HEINZLE, E. 2004. "On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors". *Biotechnology letters*. 26:763-767.
- DORAN, P.M. 2006. "Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption". *Journal of biotechnology*. 122:39-54.
- DUCOMMUN, P., RUFFIEUX, P.-A., FURTER, M.-P., MARISON, I., VON STOCKAR, U. 2000. "A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures". *Journal of biotechnology*. 78:139-147.
- DUNSTER, C.A., CHEESEMAN, K.H., MADDIX, S.P. 1997. "The effect of oxidative stress on the production of the recombinant protein, interferon  $\gamma$ , produced by chinese hamster ovary cells in stirred-batch culture". *Applied microbiology and biotechnology*. 48:198-203.
- EMERY, A.N., JAN, D.C.H., AL-RUEAI, M. 1995. "Oxygenation of intensive cell-culture system". *Applied microbiology and biotechnology*. 43:1028-1033.

- EYER, K., HEINZLE, E. 1996. "On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement". *Biotechnology and bioengineering*. 49:277-283.
- FOLLSTAD, B.D., BALCARCEL, R.R., STEPHANOPOULOS, G., WANG, D.I.C. 1999. "Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity". *Biotechnology and bioengineering*. 63:675-683.
- FOLLSTAD, B.D., WANG, D.I.C., STEPHANOPOULOS, G. 2000. "Mitochondrial membrane potential differentiates cells resistant to apoptosis in hybridoma cultures". *European journal of Biochemistry / FEBS*. 267: 6534-6540.
- FRENCH, T.W., BLUE, J.T., STOKOL, T. 1997.  
<http://www.diaglab.vet.cornell.edu/clinpath/modules/coags/tertiary.htm>
- GEBELEIN, M., MERDES, G., BERGER, M.R. 1992. "Nucleotide preparation from cells and determination of nucleotides by ion-pair high-performance liquid chromatography". *Journal of chromatography (Short communication)*. 577 : 146-150.
- GENENTECH INC. Genentech.  
<http://www.gene.com/gene/products/information/cardiovascular/activase/index.jsp>  
 (Page consultée le 11 Mai 2006)
- GHESLAGHI, R., GUO, W., SCHARER, J. *t-PA assay*. University of Waterloo:

- GILLIES, R.J., GALONS, J.-P., MCGOVERN, K.A., SCHERER, P.G., LIEN, Y.-H., JOB, C. et al. 1993. "Design and application of NMR-compatible bioreactor circuits for extended perfusion of high-density mammalian cell cultures". *NMR in biomedecine*. 6:95-104.
- GRAMER, M.J., GOOCHE, C.F. 1993. "Glycosidase activities in chinese hamster ovary cell lysat and cell culture supernatant". *Biotechnology progress* . 9:366-373.
- GREEN, D.R., REED, J.C. 1998. "Mitochondria and apoptosis". *Science*. 281:1309-1312.
- GROB, M.K., O'BRIEN, K., CHU, J.J., CHEN, D.D.Y. 2003. "Optimization of cellular nucleotide extraction and sample preparation for nucleotide pool analyses using capillary electrophoresis". *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 788:1. 103-111.
- GUAN, Y., EVANS, P.M., KEMP, R.B. 1998. "Specific heat flow rate: an on-line monitor and potential control variable of specific metabolic rate in animal cell culture that combines microcalorimetry with dielectric spectroscopy". *Biotechnology and bioengineering*. 58:464-477.
- HENDRICK, V., WINNEPENNINCKX, P., ADELKAFI, C., VANDEPUTTE, O., CHERLET, M., MARIQUE, T. et al. 2001. "Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis". *Cytotechnology*. 36: 71-83.

- HENRY, O. 2004. *Optimisation de la production de vecteurs adénoviraux dans un bioréacteur opérant en mode perfusion*. Département de Génie Chimique - Ecole Polytechnique de Montréal.
- HISIGER, S., JOLICOEUR, M. 2005a. "A multiwavelength fluorescence probe: Is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? ". *Journal of biotechnology*. 117:325-336.
- HISIGER, S., JOLICOEUR, M. 2005b. "Plant cell culture monitoring using an *in situ* multiwavelength fluorescence probe". *Biotechnology progress* . 21:2. 580-589.
- HUNT, L., BATARD, P., JORDAN, M., WURM, F.M. 2002. "Fluorescent proteins in animal cells for process development: Optimization of sodium butyrate treatment as an example". *Biotechnology and bioengineering*. 77:5. 528-537.
- KADOURI, A., BOHAK, Z. 1985. *Production of plasminogen activator by cells in culture in: Advances in Biotechnological Processes*. New York : Alan R. Liss.
- KEANE, J.T., RYAN, D., GRAY, P.P. 2003. "Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by chinese hamster ovary cells". *Biotechnology and bioengineering*. 81:211-220.
- KIMURA, R., MILLER, W.M. 1996. "Effects of elevated pCO<sub>2</sub> and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells". *Biotechnology and bioengineering*. 52:152-160.

- KLUFTH, C. 1988. *Tissue-type plasminogen activator (t-PA): Physiological and Clinical Aspects*. United States : CRC Press.
- KRATJE, R.B., LIND, W., WAGNER, R. 1994. "Evaluation of the proteolytic potential of *in vitro*-cultivated hybridoma and recombinant mammalian cells". *Journal of biotechnology*. 32:107-125.
- KUNKEL, J.P., JAN, D.C.H., JAMIESON, J.C., BUTLER, M. 1998. "Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody". *Journal of biotechnology*. 62:55-71.
- LIN, A.A., KIMURA, R., MILLER, W.M. 1993. "Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions". *Biotechnology and bioengineering*. 42:3. 339-350.
- LIN, J., TAKAGI, M., QU, Y., GAO, P., YOSHIDA, T. 1999. "Metabolic flux change in hybridoma cells under high osmotic pressure". *Journal of bioscience and bioengineering*. 87:255-257.
- LINK, T., BÄCKSTRÖM, M., GRAHAM, R., ESSERS, R., ZÖRNER, K., GÄTGENS, J. et al. 2004. "Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium". *Journal of biotechnology*. 110:51-62.

- LJUNGGREN, J., HAEGGSTROEM, L. 1994. "Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures". *Biotechnology and bioengineering*. 44:7. 808-818.
- LU, S., SUN, X., ZHANG, Y. 2005. "Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites". *Process biochemistry*. 40:5. 1917-1921.
- LUGER, K., MÄDER, A.W., RICHMOND, R.K., SARGENT, D.F., RICHMOND, T.J. 1997. "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution". *Nature*. 389:251-260.
- LUNDBERG, P., HARMSSEN, E., HO, C., VOGEL, H.J. 1990. "Nuclear magnetic resonance studies of cellular metabolism (review)". *Analytical biochemistry*. 191:193-222.
- MANCUSO, A., SHARFSTEIN, S.T., FERNANDEZ, E.J., CLARK, D.S., BLANCH, H.W. 1998. "Effect of extracellular glutamine concentration on primary and secondary metabolism of a murine hybridoma: An *in vivo* <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study". *Biotechnology and bioengineering*. 57:2. 172-186.
- MANCUSO, A., SHARFSTEIN, S.T., TUCKER, S.N., CLARK, D.S., BLANCH, H.W. 1994. "Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Biotechnology and bioengineering*. 44:5. 563-585.



- MEYER, R., WAGNER, K.G. 1985. "Nucleotide pools in suspension-cultured cells of *Datura innoxia* I. Changes during growth of the batch culture". *Planta*. 166:439-445.
- MODHA, K., WHITESIDE, J.P., SPIER, R.E. 1992 . "Dissociation of MAB production from cell division using DNA biosynthesis inhibitors". *Animal cell technology: developments, processes and products*. Sous la direction de R.E. SPIER, J.B. GRIFFITHS, C. MACDONALD. Oxford : Butterworth-Heinemann. P. 81-87.
- MONNERET, C. 2005. "Histone deacetylase inhibitors". *European journal of medicinal chemistry*. 40:1-13.
- MOORE, A., MERCER, J., DUTINA, G., DONAHUE, C.J., BAUER, K.D., MATHER, J.P. et al. 1997. "Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures". *Cytotechnology*. 23:47-54.
- MÜLLER, M., SIEMS, W., BUTTGEREIT, F., DUMDEY, R., RAPOPORT, S.M. 1986. "Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells". *European journal of biochemistry*. 161:701-705.
- MURPHY, E., GABEL, S.A., FUNK, A., LONDON, R.E. 1988. "NMR observability of ATP: preferential depletion of cytosolic ATP during ischemia in perfused rat liver.". *Biochemistry*. 27:526-528.

- NYBERG, G.B., BALCARCEL, R.R., FOLLSTAD, B.D., STEPHANOPOULOS, G.,  
WANG, D.I.C. 1999. "Metabolic effects on recombinant interferon- $\gamma$  glycosylation  
in continuous culture of Chinese hamster ovary cells". *Biotechnology and  
bioengineering* . 62:336-347.
- OZTURK, S.S., RILEY, M.R., PALSSON, B.O. 1992. "Effects of ammonia and lactate  
on hybridoma growth, metabolism, and antibody production". *Biotechnology and  
bioengineering*. 39:4. 418-431.
- PALERMO, D.P., DEGRAAF, M.E., MAROTTI, K.R., REHBERG, E., POST, L.E.  
1991. "Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese  
hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression". *Journal of  
biotechnology*. 19:35-48.
- PAVLOU, A.K., REICHERT, J.M. 2004. "Recombinant protein therapeutics - success  
rates, market trends and values to 2010". *Nature biotechnology*. 22:12. 1513-1519.
- PHILLIPS, H.A., SCHARER, J.M., BOLS, N.C., MOO-YOUNG, M. 1987. "Effect of  
oxygen on antibody productivity in hybridoma culture". *Biotechnology letters*.  
9:11. 745-750.
- POHL, G., KÄLLSTRÖM, M., BERGSDORF, N., WALLÉN, P., JÖRNVALL, H.  
1984. "Tissue plasminogen activator: Peptide analyses confirm an indirectly  
derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish  
glycosylation sites, and localize variant differences ". *Biochemistry*. 23:3701-3707.

- PRASAD, K.N., SINHA, P.K. 1976. "Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review". *In vitro*. 12:125-132.
- REICH, J.G., SEL'KOV, E.E. 1981. *Energy metabolism of the cell - a theoretical treatise*. London : Academic Press Inc.
- RESTELLI, V., WANG, M.-D.H.N., ÉTHIER, M., PERREAULT, H., BUTLER, M. 2006. "The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells". *Biotechnology and bioengineering*. 94:481-494.
- RIGGS, M.G., WHITTAKER, R.G., NEUMANN, J.R., INGRAM, V.M. 1977. "*n*-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells". *Nature*. 268:462-464.
- RUFFIEUX, P.-A., VON STOCKAR, U., MARISON, I.W. 1998. "Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific ( $qO_2$ ) oxygen uptake rates in animal cell cultures". *Journal of biotechnology*. 63:2. 85-95.
- RYLL, T., WAGNER, R. 1991. "Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells". *Journal of chromatography*. 570:77-88.

- RYLL, T., WAGNER, R. 1992. "Intracellular ribonucleotide pools as a tool for monitoring the physiological state of *in vitro* cultivated mammalian cells during production processes". *Biotechnology and bioengineering*. 40:934-946.
- SCHWEIKART, F., JONES, R., JATON, J.-C., HUGHESM, G.J. 1999. "Rapid structural characterisation of a murine monoclonal IgA  $\alpha$  chain: heterogeneity in the oligosaccharide structures at a specific site in samples produced in different bioreactor systems". *Journal of biotechnology*. 69:191-201.
- SEALY, L., CHALKLEY, R. 1978. "The effect of sodium butyrate on histone modification". *Cell*. 14:115-121.
- SENGER, R.S., KARIM, M.N. 2003. "Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein". *Biotechnology progress* . 19:1199-1209.
- SHANKLAND, E.G., LIVESEY, J.C., WISEMAN, R.W., KROHN, K.A. 2002. "Multinuclear NMR studies of an actively dividing artificial tumor". *Physiological research*. 51:49-58.
- SHARFSTEIN, S.T., TUCKER, S.N., MANCUSO, A., BLANCH, H.W., CLARK, D.S. 1994. "Quantitative *in vivo* nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism". *Biotechnology and bioengineering*. 43:11. 1059-1074.

- SIANO, S.A., MUTHARASAN, R. 1991. "NADH fluorescence and oxygen uptake responses of hybridoma cultures to substrate pulse and step changes". *Biotechnology and bioengineering*. 37:2. 141-159.
- SPELLMAN, M.W., BASA, L.J., LEONARD, C.K., CHAKEL, J.A., O'CONNOR, J.V. 1989. "Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese Hamster Ovary cells". *The Journal of biological chemistry*. 264:14100-14111.
- SUSIN, S.A., ZAMZAMI, N., KROEMER, G. 1998. "Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more". *Biochimica et biophysica acta*. 1366:151-165.
- TAKAGI, M., HUI CHING HIA, JIN HO JANG, YOSHIDA, T. 2001. "Effects of high concentrations of energy sources and metabolites on suspension culture of Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator". *Journal of bioscience and bioengineering*. 91:5. 515-521.
- TAKESADA, H., EBISAWA, K., TOYOSAKI, H., SUZUKI, E., KAWAHARA, Y., KOJIMA, H. et al. 2000. "Convenient NMR method for *in situ* observation of aerobically cultured cells". *Journal of biotechnology*. 84:3. 231-236.
- THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF WISCONSIN SYSTEM. 2002.
- [http://bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Molecular\\_Biology\\_Syllabus/tpa/tpa\\_image/tpa\\_image.htm](http://bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Molecular_Biology_Syllabus/tpa/tpa_image/tpa_image.htm)

- TOMIYA, N., AILOR, E., LAWRENCE, S.M., BETENBAUGH, M.J., LEE, Y.C. 2001. "Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography: sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells". *Analytical biochemistry*. 293:1. 129-137.
- TRITSCH, G.L., MOORE, G.E. 1962. "Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media". *Experimental cell research*. 28:360-364.
- UNITÉ MIXTE INSERM - UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER U594. Bases physiques de résonance magnétique nucléaire (Notes de cours). [http://www-u594.ujf-grenoble.fr/people/ebarbier/coursRMN\\_TPimagerie.pdf](http://www-u594.ujf-grenoble.fr/people/ebarbier/coursRMN_TPimagerie.pdf) (Page consultée le 18 Nov. 2004)
- VAN LINT, C., EMILIANI, S., VERDIN, E. 1996. "The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation". *Gene expression*. 5:245-253.
- WALSH, G. 2003. "Biopharmaceutical benchmarks-2003". *Nature biotechnology*. 21:865-870.
- WALSH, G. 2005. "Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions". *Trends in biotechnology*. 23:11. 553-558.

- WURM, F.M. 2004. "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells". *Nature biotechnology*. 22:11. 1393-1398.
- XIE, L., PILBROUGH, W., METALLO, C., ZHONG, T., PIKUS, L., LEUNG, J. et al. 2002. "Serum-free suspension cultivation of PEF.C6 cells and recombinant adenovirus production under different pH conditions". *Biotechnology and bioengineering*. 80:569-579.
- XIE, L., WANG, D.I.C. 1996a. "Energy metabolism and ATP balance in animal cell cultivation using a stoichiometrically based reaction network". *Biotechnology and bioengineering*. 52: 591-601.
- XIE, L., WANG, D.I.C. 1996b. "Material balance studies on animal cell metabolism using a stoichiometrically based reaction network". *Biotechnology and bioengineering*. 52:579-590.
- XUE, X., PIAO, J.-H., NAKAJIMA, A., SAKON-KOMAZAWA, S., KOJIMA, Y., MORI, K. et al. 2005. "Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) induces the unfolded protein responses (UPR) in a reactive species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNF $\alpha$ ". *The Journal of biological chemistry*. 280:33917-33925.
- YOON, S.K., CHOI, S.L., SONG, J.Y., LEE, G.M. 2005. "Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese Hamster Ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0°C". *Biotechnology and bioengineering*. 89:3. 345-356.

- YUN, H.S., GYUN, M.L. 2005. "Enhanced human thrombopoietin production by sodium butyrate addition to serum-free suspension culture of Bcl-2-overexpressing CHO cells". *Biotechnology progress* . 21:1. 50-57.
- ZHANG, F., KANG, E.T., NEOH, K.G., WANG, P., TAN, K.L. 2001. "Surface modification of stainless steel by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction of protein adsorption". *Biomaterials*. 22:1541-1548.
- ZUPKE, C., SINSKEY, A.J., STEPHANOPOULOS, G. 1995. "Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas". *Applied microbiology and biotechnology*. 44:27-36.
- ZUPKE, C., STEPHANOPOULOS, G. 1994. "Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices". *Biotechnology progress* . 10:5. 489.



## ANNEXES

Annexe A : Mesure de nucléotides .....	132
Annexe B : Protocole de mesure de glucose.....	137
Annexe C : Protocole de mesure de glutamine .....	139
Annexe D : Protocole de mesure de lactate .....	142
Annexe E : Protocole de mesure de l'ammoniaque .....	144
Annexe F : Protocole de mesure du t-PA actif.....	146
Annexe G : Calcul de $k_{La}$ .....	148
Annexe H : Développement des méthodes d'extraction pour les mesures de HPLC ...	150
Annexe I : Développement des méthodes de mesures de RMN .....	158
Annexe J : Données de débits de gaz, pH et O <sub>2</sub> dissous pour les cultures en réacteur .	166
Annexe K : Rendements nutritionnels, énergétiques et de productivité .....	173

## **ANNEXE A : MESURE DE NUCLÉOTIDES**

### **A.1. Protocole d'extraction**

#### **1. Extraction**

- 1.1. Dans trois tubes de centrifugation de 50mL, pipeter un volume précis de suspension permettant d'obtenir un nombre total de cellules d'environ  $3 \times 10^6$  cells/mL (par tube). Noter ce volume.
- 1.2. Avec le pipeteur de 1mL, ajouter par tube de centrifugation 500 $\mu$ L d'acide perchlorique (PCA) refroidi à 0-4°C. Remettre le culot en suspension en faisant des pipetages répétés. Transférer les suspensions dans trois eppendorfs. Conserver les tubes de centrifugation sur la glace.
- 1.3. Changer d'embouts entre les échantillons, mais les conserver.
- 1.4. Laisser reposer sur la glace 2 minutes.
- 1.5. Centrifuger les eppendorfs 3 minutes; 10 000g, 4°C
- 1.6. Transférer avec une pipette Pasteur les surnageants dans les trois tubes de centrifugation de 50mL utilisés préalablement et maintenus sur la glace.
- 1.7. Ajouter 500 $\mu$ L de PCA à chaque eppendorf.
- 1.8. Homogénéiser les suspensions en faisant des pipetages répétés en utilisant les mêmes embouts que ceux utilisés lors de la première extraction (changer d'embout entre les échantillons).
- 1.9. Laisser reposer sur la glace 2 minutes.
- 1.10. Centrifuger les eppendorfs 3 minutes; 10 000g, 4°C

- 1.11. Transférer les surnageant avec une pipette Pasteur dans les mêmes tubes de centrifugation de 50mL maintenus dans la glace.

## **2. Neutralisation**

- 2.1. Les surnageants sont neutralisés par l'ajout de 0,30mL de  $\text{KHCO}_3$  2M. Neutraliser les trois surnageants en ajoutant lentement à chacun 0,10mL de  $\text{KHCO}_3$  2M refroidi à 0-4°C avec un pipeteur de 200 $\mu\text{L}$ . S'assurer de maintenir l'échantillon dans la glace et d'ajouter la solution basique lentement pour ne pas générer trop de chaleur pouvant dégrader les composés (réaction exothermique). Puis, ajouter 0,20mL de  $\text{KHCO}_3$  par eppendorfs avec un pipeteur de 200 $\mu\text{L}$ .
- 2.2. Centrifuger les tubes de centrifugation de 50mL pour 1min à 4000RPM, 4°C.
- 2.3. Transférer le plus d'extrait possible dans des eppendorfs (le volume n'est pas important).
- 2.4. Centrifuger les eppendorfs 3 minutes; 15 000g, 4°C pour retirer le précipité de perchlorate de potassium
- 2.5. Transférer le surnageant dans un vial pour stocker dans l'azote liquide jusqu'aux mesures HPLC-MS

## **3. Préparation des échantillons pour les mesures HPLC-MS**

- 3.1. Décongeler les extraits cellulaires à analyser et maintenir dans un bain de glace jusqu'aux mesures.
- 3.2. Si beaucoup de précipité s'est formé suite à la congélation, il peut être nécessaire de centrifuger l'échantillon 3 minutes; 15 000g, 4°C pour retirer le précipité de perchlorate de potassium.

- 3.3. Filtrer les échantillons avec une seringue de 3mL munie d'un filtre de 0,22µm en nitrocellulose.
- 3.4. Transférer 120µL d'extrait filtré dans un insert placé dans un vial HPLC (la concentration en nucléotides des échantillons doit être inférieure à 15µM. Si nécessaire, diluer les échantillons)

#### **A.2. Préparation des standards**

Les standards des nucléotides ont été préparés selon les données présentées dans le tableau suivant. Les masses pesées ont été dissoutes dans un volume connu d'eau déionisée. Les puretés des poudres ont été corrigées pour considérer les teneurs en eau et autres composés. Les concentrations molaires affichées dans le tableau ont été ajustées pour tenir compte de ces impuretés (en multipliant par les pourcentages corrigés de pureté).

Les standards ont été stockés à -20°C.

Composés													
	ATP	ADP	AMP	CTP	CTP	UTP	G-6-P	F-6-P	NAD	β-NADP	UDPGlcNAc	UDP-Gal	UDPG
No.Cat. (Sigma)	FL-AAS	A-2754	A-1752	C-1506	G-8877	U-6625	G-7879	F-3627	N-1511	N-0505	U-4375	U-5252	94335
Lot	023K7400	073K7007	113K70201	082K1643	015K7012	064K7026	093K3789	043K7005	044K7032	054K7036	035K7031	084K7353	054204/1
MW	551,14	427,2	347,22	527,12	523,18	550,09	282,12	304,1	663,43	765,39	651,32	651,32	610,27
Pureté	98,1	98	100	95	96	96	100	97	100	97	98,6	99	99,7
Sel?		oui	oui	oui	oui	Oui	oui	oui		oui	oui	oui	oui
Hydraté?	Oui				oui	Oui		oui					
% eau		5	18	11	3,5	8	1	9	9	7	4,9	7	5,3
% autres composés		10,3	7	3	12,1	14,4	8,3	15,7		5,1	11,2	10	
Pureté corrigée	98,1	83,006	75	81,7	81,024	74,496	90,7	73,041	91	85,263	82,7254	82,17	94,4159
Masse pesée (g)	0,0009	0,00314	0,00233	0,00352	0,00348	0,00368	0,00156	0,00234	0,00375	0,00475		0,00321	0,00329
Volume d'eau dionisée (mL)	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5	0,5
Concentration (mM)	1,602	12,2022	10,0657	10,9115	10,7788	9,9673	10,0306	11,2408	10,2874	10,5828	10	8,0994	10,18

### **A.3. Calcul des concentrations spécifiques**

Les mesures obtenues par HPLC-MS sont en  $\mu\text{M}$ . Afin de les mettre en  $\text{nmole}/10^6\text{cellules}$ , les données brutes ont été traitées ainsi :

$$\left( \text{Conc.}_{\text{cell.}} \left[ \frac{\text{nmol}}{10^6 \text{ cells}} \right] \right) = \frac{\left( \text{Conc.}_{\text{extrait}} \left[ \frac{\mu\text{mole}}{\text{L}} \right] \right) \cdot (V_{\text{extrait}} [\text{mL}]) \cdot \left( \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \right) \cdot \left( \frac{10^3 \text{ nmole}}{1\mu\text{mole}} \right)}{(\text{Compte cell.} [10^6 \text{ cells / mL}]) \cdot (V_{\text{échantillon}} [\text{mL}])}$$

où  $\text{Conc}_{\text{extrait}}$  = données brutes des mesures HPLC-MS

$V_{\text{extrait}}$  = volume de l'extrait (1,3mL)

Compte cell = compte cellulaire de l'échantillon avant extraction

$V_{\text{échantillon}}$  = volume de la suspension initiale (dont le culot a été extrait)

## **ANNEXE B : PROTOCOLE DE MESURE DE GLUCOSE**

Les mesures de glucose ont été faites avec le réactif Glucose Reagent (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada; Cat.No.G-3293).

### **1. Préparation de la courbe de calibration**

- 1.1 Équilibrer le réactif et les solutions standards à température de la pièce.
- 1.2 Mettre 700 $\mu$ L de réactif dans des cuvettes de spectrométrie. Ajouter 7 $\mu$ L de solution standard ou blanc.
- 1.3 Poser un parafilm sur l'embouchure de la cuvette et agiter en renversant pour homogénéiser les solutions.
- 1.4 Incuber 5 minutes à la température de la pièce (ou jusqu'à ce que l'absorbance soit stable. Toutefois, ne pas dépasser 30 minutes, temps de stabilité de la couleur de la suspension suite à la réaction finale).
- 1.5 Essuyer les cuvettes avec un kimwipes.
- 1.6 Insérer la cuvette dans le spectrophotomètre (aligner la cuvette de telle sorte que la flèche pointe vers le faisceau situé à droite). Lire l'absorbance à 340nm.
- 1.7 Après avoir mesuré l'absorbance, construire une courbe de calibration en traçant l'absorbance en fonction de la concentration en glucose de la solution standard. Si la courbe obtenue n'est pas linéaire, recommencer.
- 1.8 Afficher l'équation de la courbe de tendance linéaire sur le graphique.

### **2. Préparation des échantillons**

- 2.1 Équilibrer le réactif et les échantillons à température de la pièce.

- 2.2 Mettre 700 $\mu$ L de réactif dans des cuvettes de spectrométrie. Ajouter 7 $\mu$ L de l'échantillon.
- 2.3 Répéter les étapes 1.3 à 1.6
- 2.4 Déterminer la concentration en glucose de l'échantillon en employant l'équation de la courbe de tendance linéaire sur le graphique de calibration.
- 2.5 Faire certaines mesures en triplicata afin de vérifier la justesse des mesures



## **ANNEXE C : PROTOCOLE DE MESURE DE GLUTAMINE**

Les mesures de glutamine ont été réalisées avec le kit Glutamine assay kit (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada; Cat.No. GLN-2), renfermant les items suivants:

Gluamine Assay : Reaction buffer (Sigma, Cat.No. G7531)  
Gluamine Assay : Enzyme preparation (Sigma, Cat.No. G7406)  
Gluamine Assay : Color reagent (Sigma, Cat.No. G7156)  
Gluamine Assay : Standard (60mM L-glutamine) (Sigma, Cat.No. G7656)  
Gluamine Assay : Diluent buffer, 10x (Sigma, Cat.No. G7281)

### **1. Préparation de la courbe de calibration**

1.1 Pour chaque solution standard, pipeter successivement dans un eppendorf :

50µL de tampon de réaction

300µL de la solution standard

500 µL de tampon de dilution 1x

150µL de préparation enzymatique (Enzyme preparation)

1.2 À l'aide du vortex, agiter quelques secondes jusqu'à ce que la solution soit homogène

1.3 Incuber 1 heure dans le bain d'eau à 37°C.

1.4 Ajouter 100µL de réactif teinté (Color Reagent).

1.5 À l'aide du vortex, agiter quelques secondes jusqu'à ce que la couleur soit uniforme

1.6 Laisser reposer à la température de la pièce 5 minutes.

1.7 Transférer le contenu de l'eppendorf dans une cuvette spectrométrique.

- 1.8. Lire l'absorbance à 550nm (ne pas attendre plus de 30 minutes après l'ajout du réactif teinté avant de faire la lecture, temps de stabilité de la couleur de la suspension suite à la réaction finale).
- 1.9 Après avoir mesuré l'absorbance, construire une courbe de calibration en traçant l'absorbance en fonction de la concentration en glutamine de la solution standard (Se référer à l'annexe 1). Si la courbe obtenue n'est pas linéaire, recommencer.
- 1.10 Afficher l'équation de la courbe de tendance linéaire sur le graphique.

## **2. Préparation des échantillons**

La référence interne est employée pour détecter toute inhibition ou accentuation de la réaction par les composés contenus dans le milieu de culture. Des mesures avec des références internes (concentration de L-glutamine 2mM) doivent être effectuées pour chaque milieu de culture utilisé.

### **2.1 Avec référence interne**

Pour chaque échantillon prélevé durant la culture, pipeter successivement dans un eppendorf :

50µL de tampon de réaction

300µL de la solution standard ou d'échantillon

10µL du standard de L-glutamine 60mM

490µL du tampon de dilution 1x.

## 2.2 Sans référence interne

Pour chaque échantillon prélevé durant la culture, pipeter successivement dans un eppendorf :

50µL de tampon de réaction

300µL de la solution standard ou d'échantillon

500 µL de tampon de dilution 1x

## 2.3 Ajouter 150µL de préparation enzymatique (Enzyme preparation)

Répéter les étapes 1.2 à 1.8

## 2.4 Déterminer la concentration non corrigée en glutamine du standard ou de l'échantillon en employant l'équation de la courbe de tendance linéaire sur le graphique de calibration (section 7.4)

## 2.5 Calculer le degré de récupération selon la formule suivante:

$$\text{Récupération} = D = \frac{(A - B)}{C}$$

où A = Concentration en L-glutamine dans l'échantillon avec référence interne

B = Concentration en L-glutamine dans l'échantillon sans référence interne

C = Concentration en L-glutamine (2mM) contenue dans la référence interne

D = Degré de récupération

La concentration en glutamine corrigée est calculée selon la formule suivante:

$$[L - glutamine]_{\text{corrigée}} = E / D$$

où D = Degré de récupération

E = Concentration en L-glutamine non corrigée déterminée à partir de la courbe de calibration

## **ANNEXE D : PROTOCOLE DE MESURE DE LACTATE**

Les mesures de lactate ont été réalisées avec le réactif Lactate reagent (Trinity Biotech, Co Wicklow, Ireland distribué par InterMedico, Ontario, Canada; Cat.No. 735-10)

### **1. Préparation du réactif**

- 1.1. À l'aide d'une pipette, ajouter directement dans la fiole de réactif, le volume d'eau déionisée indiqué sur l'étiquette
- 1.2. Après addition d'eau, boucher le flacon et mélanger immédiatement par inversions répétées. NE PAS SECOUER

### **2. Préparation de la courbe de calibration**

- 2.1 Pipeter 1mL de réactif Lactate dans une cuvette spectrophotométrique
- 2.2. Avec une pipette de 10 $\mu$ L, ajouter 10  $\mu$ L de blanc ou standard
- 2.3. Couvrir la cuvette de parafilm et agiter en renversant
- 2.4. Incuber les cuvettes à 5-10minutes
- 2.5. Essuyer les cuvettes avec un kimwipes.
- 2.6. Insérer la cuvette dans le spectrophotomètre (aligner la cuvette de telle sorte que la flèche pointe vers le faisceau situé à droite). Lire l'absorbance à 540nm (ne pas attendre plus de 10 minutes après l'incubation pour faire la lecture).
- 2.7 Après avoir mesuré l'absorbance, construire une courbe de calibration en traçant l'absorbance en fonction de la concentration en lactate de la solution standard.  
Si la courbe obtenue n'est pas linéaire, recommencer.
- 2.8 Afficher l'équation de la courbe de tendance linéaire sur le graphique.

### **3. Préparation des échantillons**

- 3.1 Pipeter 1mL de réactif Lactate dans une cuvette spectrophotométrique
- 3.2. Avec une pipette de 10 $\mu$ L, ajouter 10  $\mu$ L d'échantillon
- 3.3. Couvrir la cuvette de parafilm et agiter en renversant
- 3.4. Incuber les cuvettes à 5-10minutes
- 3.5. Essuyer les cuvettes avec un kimwipes.
- 3.6. Insérer la cuvette dans le spectrophotomètre (aligner la cuvette de telle sorte que la flèche pointe vers le faisceau situé à droite). Lire l'absorbance à 540nm (ne pas attendre plus de 10 minutes après l'incubation pour faire la lecture).

### **4. Calcul de la concentration en lactate**

- 4.1. Calculer la concentration en lactate l'équation de la courbe de calibration
- 4.2. Convertir les résultats en mM en multipliant la valeur obtenue en mg/l par 0,0111.

## ANNEXE E : PROTOCOLE DE MESURE DE L'AMMONIAQUE

Les mesures d'ammoniaque ont été réalisées avec le kit Ammonia Assay Kit (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada; Cat.No. AA0100)

### 1. Mesure d'absorbance

Des mesures d'absorbance sont réalisées sur le réactif (témoin), les échantillons et un standard inclus dans le kit.

1.1. Dans des cuvettes spectrométriques, pipeter successivement :

Cuvette	Réactif	Solution standard	Échantillon	Eau déionisée
Réactif (témoin)	1.0mL	-	-	100µL
Échantillon(s)	1.0mL	-	100µL	-
Standard	1.0mL	50µL	-	-

1.2. Couvrir les cuvettes de parafilm et agiter en faisant des inversions répétées

1.3. Laisser reposer à la température ambiante (18-35°C) 5 minutes

1.4. Mesurer l'absorbance des solutions à 340nm

1.5. Ajouter 10µL de L-glutamate dehydrogenase par cuvette

1.6. Couvrir les cuvettes de parafilm et agiter en faisant des inversions répétées

1.7. Laisser reposer à la température ambiante (18-35°C) 5 minutes

1.8. Mesurer l'absorbance des solutions à 340nm

### 2. Calcul de la concentration en ammonium

2.1. Calculer les décroissances en absorbance pour le témoin, les échantillons et le

standard. Pour chacun :  $\Delta A_{340}(\text{Témoin, Échantillon ou Standard}) = A_{\text{initial}} - A_{\text{final}}$

2.2. Corriger les valeurs d'absorbance des échantillons et du standard avec celle du

$$\text{témoin : } A = \Delta(\Delta A_{340}) = \Delta A_{340}(\text{Échantillon ou Standard}) - \Delta A_{340}(\text{Témoin})$$

2.3. Calculer la concentration en ammoniacale selon la formule suivante:

$$mg \text{ NH}_3 / ml = \frac{(A)(TV)(MW_{\text{NH}_3})(F)}{(\epsilon)(d)(SV)(\text{Facteur de conversion de } \mu\text{g à mg})}$$

$$mg \text{ NH}_3 / ml = \frac{(A)(TV)(17)(F)}{(6,22)(1)(SV)(10E3)}$$

$$mg \text{ NH}_3 / ml = \frac{(A)(TV)(F)}{(SV)} \times 0,00273$$

où  $A = \Delta(\Delta A_{340})$  des Échantillons ou Standard

TV = Volume total d'analyse [ml]

SV = Volume de l'échantillon [ml]

MW ammoniacale = 17g/mole ou 17  $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$

F = Facteur de dilution lors de la préparation de l'échantillon

$\epsilon$  = Coefficient millimolaire d'extinction du NADPH à 340nm [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  or (ml/ $\mu\text{moles})(1/\text{cm})$ ]

d = Trajet de la lumière [cm] = 1cm

### 3. Vérification de la validité du test

L'efficacité du test est jugée acceptable si la concentration en ammonium mesurée dans le standard est à l'intérieur d'une plage de  $\pm 5\%$  de la valeur spécifiée (typiquement 10 $\mu\text{g/mL}$ )

## ANNEXE F : PROTOCOLE DE MESURE DU T-PA ACTIF

Les mesures de t-PA actif ont été réalisées avec le réactif Chromozym t-PA (Roche Diagnostics, Quebec, Canada; Cat. No. 11 093 037 001) et un standard de t-PA humain avec une activité spécifique de 630KU/mg protéine (EMD Biosciences, Inc, Calbiochem brand, Californie, USA; Cat.No. 612200, lot B67184).

### 1. Mesure d'absorbance

- 1.1. Préparer des standards de t-PA humain avec des concentrations entre 0 et 30mg/L de t-PA. Noter l'activité spécifique (IU/mg de protéine) du standard pur.

### 2. Mesure d'absorbance

- 2.1. Dans des puits de spectrophotométrie, pipeter les composés indiqués au tableau suivant et suivre les étapes :

Étapes à suivre	(I) Échantillon de t-PA ou standard	(II)* Réactif témoin (blanc)	(III) Échantillon témoin (blanc)	(IV) Échantillon + Réactif témoin (blanc)
Échantillon (µL)	60	60	-	-
Ajout du mélange de réactifs (IV) (µL)	200	-	200	-
Ajout de tampon Tris (I) (µL)	-	200	60	260
<b>Agiter et incubé à 37 °C pour 30 minutes. Arrêter la réaction par ajout d'acide citrique</b>				
Ajout d'acide citrique (III) (µL)	100	100	100	100
<b>Prendre une mesure d'absorbance. Noter le temps.</b>				

\*Préparer également un témoin II avec le standard le plus dilué, en remplaçant les 60µL d'échantillon par 60µL de solution standard 0,5mg/L.



- 2.2. Placer la plaque multipuits, sans couvercle, sur le support du spectrophotomètre.
- 2.3. Faire une mesure d'absorbance
- 2.4. Corriger les valeurs d'absorbance (des échantillons et des standards) selon la formule:  $\Delta Abs_{\text{échantillon ou standard}} = [Abs(I) - Abs(III)] - [Abs(II) - Abs(IV)]$

### 3. Calcul des concentrations en t-PA actif

- 3.1. Tracer une courbe de calibration de  $\Delta Abs_{\text{standard}}$  en fonction de la concentration en mg/L des standards de t-PA.
- 3.2. À l'aide de l'équation de la droite, convertir les valeurs d'absorbance  $\Delta Abs_{\text{échantillon}}$  en concentration.

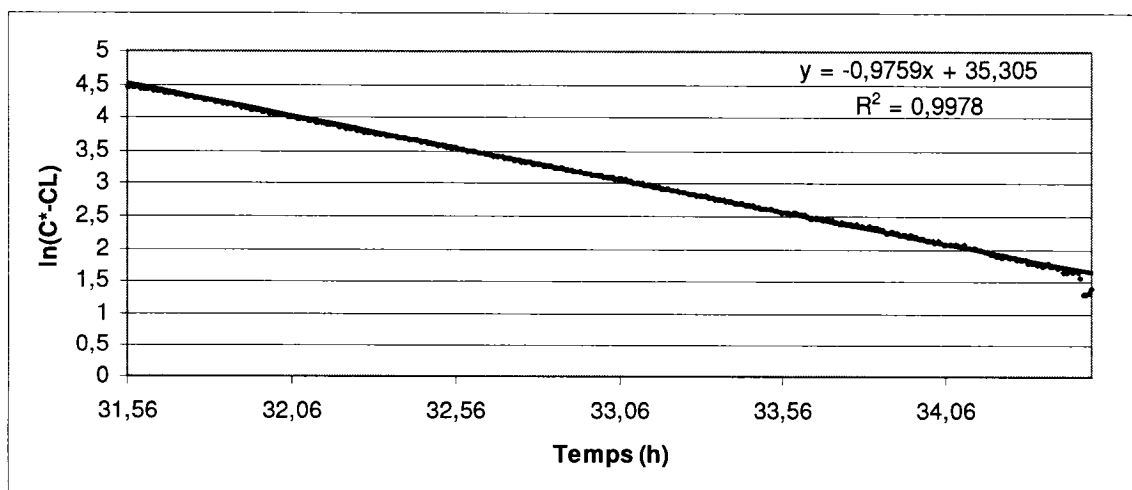
### 4. Calcul de l'activité du t-PA

- 4.1. Tracer une courbe de calibration de  $\Delta Abs_{\text{standard}}$  en fonction de la l'activité en IU/mL des standards de t-PA.
- 4.2. À l'aide de l'équation de la droite, convertir les valeurs d'absorbance  $\Delta Abs_{\text{échantillon}}$  en activité.

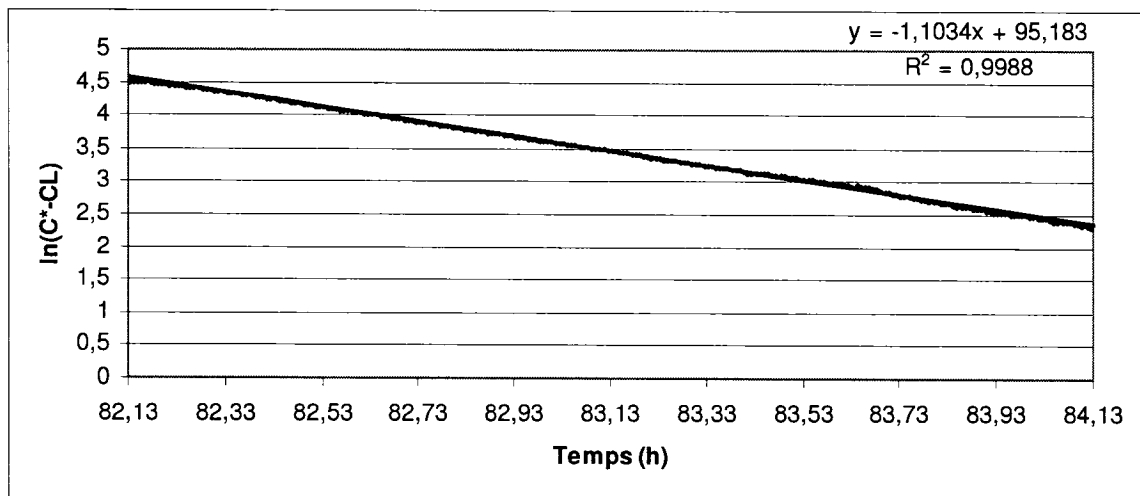
## ANNEXE G : CALCUL DE $k_LA$

Le  $k_La$  a été mesuré dans l'eau ( $V = 2,7L$ ) à  $37^\circ C$  60RPM en bullant du  $N_2$  dans la cuve pour évacuer tout l'air s'y trouvant, puis en notant l'évolution de l'oxygène dissous dans le temps en réalimentant avec un débit de 180mL air/min et 20mL  $CO_2$ /min jusqu'à ce que la solution soit saturée. La pente d'un graphique du logarithme de la concentration à saturation moins la concentration dans le milieu en fonction du temps donne alors un estimé du  $k_La$ . On obtient ainsi la valeur du  $k_La$  dans l'eau pour un débit d'alimentation et une vitesse d'agitation donnée.

Les pentes des deux graphiques suivants donnent les valeurs de  $k_La$  (seules les portions linéaires de la courbe sont représentées). En raison de l'alimentation avec 10% $CO_2$ , la valeur théorique de la concentration en oxygène dissous à saturation ( $C^*$ ) pour  $T = 37^\circ C$  et  $P=1atm$  est de 90%. Une valeur légèrement différente pourrait être obtenue pour des mesures faites avec le milieu.



**Figure G.1.** Mesure de  $k_LA$  dans de l'eau distillée (Débit Air = 180mL/min, Débit  $CO_2$  = 20mL/min, agitation = 60RPM,  $T=37^\circ C$ ,  $C^* = 92,41\%$ )



**Figure G.2. Mesure de  $k_LA$  dans de l'eau distillée (Débit Air = 180mL/min, Débit  $CO_2$  = 20mL/min, agitation = 60RPM,  $T=37^\circ C$ ,  $C^*= 92,65\%$ )**

Un  $k_{La}$  moyen de  $1,04h^{-1}$  est estimé

## **ANNEXE H : DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES D'EXTRACTION POUR LES MESURES DE HPLC**

### **H.1. Introduction**

La préparation des échantillons biologiques pour les mesures HPLC exige l'enlèvement préalable des protéines et autres macromolécules pouvant interférer lors des analyses. Pour ce faire, plusieurs méthodes sont employées. Alors que la précipitation des protéines avec des sels ne permet pas d'enlever complètement les protéines, l'extraction avec des solvants organiques, tel le méthanol, est peu efficace, car les nucléotides n'ont qu'une faible solubilité dans ces solvants. Finalement, les acides forts sont largement employés, mais ils ont le désavantage de briser les liaisons triphosphates et diphosphates (Gebelein, Merdes et Berger 1992) et l'extraction au PCA peut interférer avec les mesures HPLC par phase inverse avec appariement d'ions (rendement de 58%) (Au, Su et Wientjes 1989). Des essais d'extraction à base d'une solution d'acétonitrile ont montré que de meilleurs résultats pouvaient être obtenus (Grob, O'Brien, Chu, et Chen 2003; Au, Su et Wientjes 1989), alors que d'autres études ont montré que des rendements élevés étaient obtenus pour des extractions à l'acide perchlorique (Tomiya, Ailor, Lawrence, Betenbaugh, et Lee 2001; Ryll et Wagner 1991).

Ainsi, afin de valider la méthode d'extraction, trois procédures ont été dans un premier temps envisagées, soit à base d'acide trichloroacétique, d'acide perchlorique et d'acétonitrile.

## **H.2. Méthode d'extraction**

### **H.2.1. Extraction à l'acide trichloroacétique**

Chaque culot cellulaire stocké dans l'azote liquide (environ  $2,5 \times 10^8$  cellules) a été décongelé, puis maintenu sur la glace. Les composés intracellulaires des culots cellulaires ont été extraits avec 6mL d'acide trichloroacétique 6%. La suspension a été mise dans un bain sonicateur glacé 15s avant d'être maintenue sur la glace 15 minutes. Elle a alors été centrifugée à 4°C et 14 000g pour 10 minutes. Le surnageant a été neutralisé et lyophilisé 48 heures. L'extrait a finalement été resuspendu dans 1.8mL d'une solution tampon de pH = 7,5 (50mM CDTA, 50mM HEPES, 10% D<sub>2</sub>O, 1,206mM MPA), filtré et stocké à -20C jusqu'à ce que soit réalisé les mesures de RMN.

### **H.2.2. Extraction à l'acide perchlorique**

La méthode d'extraction employée est similaire à celle utilisée par Ryll et Wagner (1991) et Nyberg, Balcarcel, Follstad, Stephanopoulos, et Wang (1999). Dans le développement de la méthode, certains culots cellulaires ont été lavés à la solution saline d'autres non. Les composés intracellulaires des culots cellulaires, maintenus sur la glace, ont été extraits en présence de 500µL d'acide perchlorique 0,5M. Les suspensions ont été homogénéisées avec un vortex environ une minute avant d'être maintenues sur la glace 2 minutes. Les suspensions ont alors été centrifugées à 4°C et 10 000g pour 3 minutes. Les surnageants ont été récupérés et les culots cellulaires ont été extraits une seconde fois en présence de 500µL d'acide perchlorique 0,5M. Les culots cellulaires ont

été mis en suspension à l'aide du bain sonicateur refroidi à 4°C, puis les suspensions ont été homogénéisées avec un vortex environ 1 minute avant d'être maintenues sur la glace 2 minutes. Les suspensions ont alors été centrifugées à 4°C et 10 000g pour 3 minutes et les surnageants ont été récupérés et joints à ceux de la première extraction. Les surnageants ont été neutralisés avec 0,30mL de  $\text{KHCO}_3$  2M. En raison d'un précipité de perchlorate de potassium formé lors de la réaction de neutralisation, les suspensions sont alors centrifugées de nouveau à 4°C et 15 000g pour 3 minutes.

### **H.2.3. Extraction à l'acétonitrile**

La méthode d'extraction employée est décrite par Au, Su et Wientjes (1989). Les macromolécules des culots cellulaires, maintenus sur la glace, ont été précipitées en présence de 300  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile. Après moins de deux minutes, 1mL d'eau a été ajouté pour extraire les composés cellulaires. Les suspensions ont alors été centrifugées à 4°C et 13 000g pour 1 minute. Les surnageants récupérés ont été stockés dans l'azote liquide jusqu'aux analyses HPLC-MS.

### **H.3. Résultats**

La validation des méthodes d'extraction pour les mesures de HPLC a été réalisée par une série de tests. L'extraction à base d'acide trichloroacétique a été rejetée de prime abord en raison de son incompatibilité avec les colonnes HPLC employées. Les degrés de récupération entre une extraction à l'acétonitrile et à l'acide perchlorique ont été comparés. Par la suite, l'effet du lavage à la solution saline des culots cellulaires ou de

leur stockage préalablement à leur extraction a été considéré. Finalement, la zone de linéarité des mesures ainsi que le degré de récupération de la méthode d'extraction choisie ont été établis.

### H.3.1. Essai d'extraction à l'acétonitrile

Le degré de récupération a été établi pour des échantillons cellulaires. Au troisième jour d'une culture (phase exponentielle), des culots cellulaires de  $3\text{-}5 \times 10^6$  cellules (échantillon en duplicata) ont subi un lavage à la solution saline, un ajout de 6,25nmole de chaque composés standards, puis une extraction à l'acétonitrile.

À titre de valeur de référence des extractions ont également été réalisées sur des culots cellulaires, non lavés à la solution saline, auxquels aucun composé pur n'a été ajouté.

Les extraits ont été stockés dans l'azote liquide en attente des mesures HPLC-MS

**Tableau H1 : Degré de récupération par une extraction avec une solution d'acétonitrile**

Composé	Degré de récupération (%)
ATP	$-17 \pm 32$
ADP	$74 \pm 9$
AMP	$4 \pm 2$
NADPH	-
UDPG	$94 \pm 7$
G-6-P	-
F-6-P	-
PEth	$-164 \pm 10$
CTP	$54 \pm 7$
GTP	$18 \pm 8$
UTP	$33 \pm 8$

La méthode d'extraction à l'acétonitrile n'a pas donné des degrés de récupération suffisants.

### H.3.2. Effet du stockage des culots cellulaires

Trois conditions de stockage ont été étudiées sur deux semaines : l'entreposage du culot cellulaire à -20°C et celui du culot cellulaire acidifié (suspension d'acide perchlorique) à -20°C ou dans l'azote liquide. Le stockage de la suspension acide à -20°C semble causer la dégradation de l'ATP en ADP alors que lors du stockage des culots cellulaires à -20°C, tous les composés sont dégradés. Finalement, bien que le stockage dans l'azote liquide ait permis d'obtenir le degré de récupération le plus élevé, il entraîne des pertes de liquide dû au transfert de l'extrait dans un vial de cryoconservation.

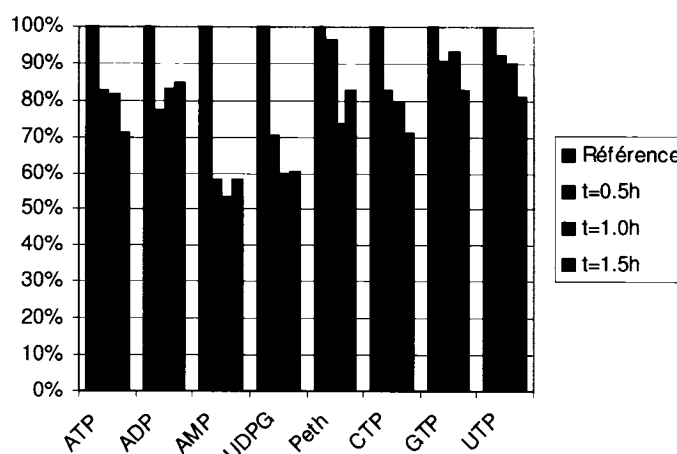
**Tableau H2 : Degré de récupération des échantillons selon leurs conditions de stockage**

Conditions de stockage	ATP	ADP	AMP	UDPG	Peth	CTP	GTP	UTP
<b>Extraction immédiate</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Suspension acide (-20°C)</b>	25%	137%	94%	1%	111%	40%	32%	22%
<b>Suspension acide (N<sub>2</sub> liq)</b>	81%	76%	70%	68%	85%	117%	100%	75%

### H.3.3. Effet du lavage des culots à la solution saline

L'effet du double lavage à la solution saline sur le rendement de l'extraction a été déterminé en comparant les concentrations en composés intracellulaires obtenues suite à des extractions sur des culots lavés à la solution saline ou sans lavage (rendement posé à 100%).





**Figure H1 :** Effet en fonction du temps du double lavage à la solution saline sur le degré de récupération de l'extraction à l'acide perchlorique (Référence : Échantillons non lavés à la solution saline)

#### H.3.4. Degré de récupération

Le degré de récupération a dans un premier temps été déterminé pour les solutions standards par l'ajout de 100µL d'acide perchlorique 5M à 1000µL de solution standard (concentration de 25µM par composé), le tout suivi par une neutralisation avec 0,30mL de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Ces échantillons ont été répétés en triplicata.

Par la suite, le degré de récupération a été établi pour des échantillons cellulaires. Au deuxième et troisième jour (phase exponentielle) des cultures CTRL et NaBu-48h, des culots cellulaires d'environ 3x10<sup>6</sup> cellules (échantillon en triplicata) auxquels entre 3-6,5 nmoles par composés purs avaient été ajoutés ont subi une double extraction au PCA (méthode d'extraction améliorée présentée à la section Méthodologie du mémoire). À titre de valeur de référence des extractions ont également été réalisées sur des culots cellulaires auquel aucun composé pur n'a été ajouté. Les extraits ont été stockés dans

l'azote liquide en attente des mesures HPLC-MS. Les résultats présentés dans le tableau suivant sont la moyenne de 8 essais (3 seulement pour UDPGNac et UDPG+UDPGal).

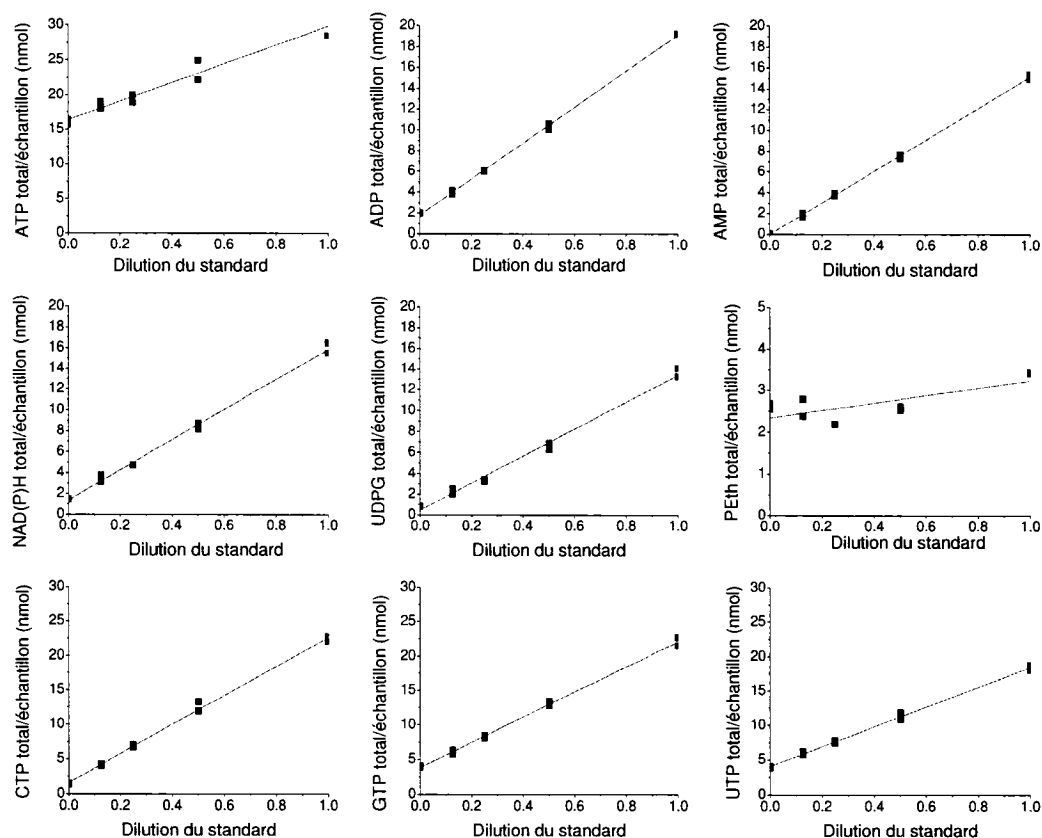
**Tableau H3 : Degré de récupération par une double extraction à l'acide perchlorique**

Composé	Degré de récupération (%)	
	Solution standard	Échantillon + standard
ATP	102 ± 9	116 ± 14
ADP	98 ± 4	95 ± 11
AMP	104 ± 2	80 ± 7
UDPG	113 ± 2	-
UDPG + UDPGal	-	71 ± 1
PEth	56 ± 1	-
CTP	110 ± 11	88 ± 12
GTP	98 ± 10	86 ± 12
UTP	100 ± 6	104 ± 8
NAD		54 ± 35
UDP-GNac		91 ± 4

### H.3.5. Linéarité des mesures

#### *H.3.5.1 Linéarité des mesures sur des extraits*

La figure suivante montre la linéarité des mesures HPLC-MS sur des extraits cellulaires après des ajouts successifs de composés standards.



**Figure H2 : Zone de linéarité des mesures HPLC-MS sur des extraits cellulaires auxquels des composés standards ont été ajoutés**

### *H.3.5.2. Linéarité des mesures de solutions standards*

Des solutions standards pures ont été mesurées par HPLC-MS par Steve Hisiger. Pour les différents composés, la zone de linéarité est valide jusqu'à une concentration d'environ 15µM.

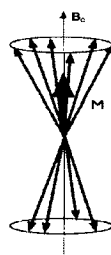
## **ANNEXE I : DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES DE MESURES DE RMN**

### **I.1 Principe de la RMN**

Parmi les méthodes de quantification des états physiologiques cellulaires, la spectroscopie de masse, l'emploi de traceurs isotopiques ainsi que la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont couramment employés. Les nombreuses innovations dans le domaine de la RMN depuis les premières observations de la résonance magnétique nucléaire dans les années 1940 en ont fait une discipline en soi. Dans le domaine des biotechnologies, l'application de techniques de RMN est désormais fréquente (Cohen, Motiei, Carmi, Shiperto, Yefet, et Ringel 2004; Mancuso, Sharfstein, Tucker, Clark, et Blanch 1994; Sharfstein, Tucker, Mancuso, Blanch, et Clark 1994; Zupke et Stephanopoulos 1994). Sa haute résolution rend possible la détermination de structures de molécules aussi complexes que les protéines.

Les techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) s'avèrent être des outils puissants pour obtenir une banque unique d'informations sur les voies métaboliques et leurs régulations. Ces techniques de RMN reposent sur l'existence de moment magnétique associé engendré par le mouvement de spin nucléaire I. Ce spin caractérise le noyau de chaque atome et peut être schématisé par une aiguille aimantée. Placé dans un champ magnétique statique  $B_0$ , cet aimant microscopique peut prendre une orientation stable parallèle au champ (état  $\alpha$ ) ou instable antiparallèle (état  $\beta$ ). Des niveaux énergétiques distincts peuvent ainsi être obtenus dont la différence est obtenue par la relation  $\Delta E = \hbar \gamma B_0$  où  $\gamma$  correspond au rapport gyromagnétique, propre à chaque

isotope et proportionnel à la fréquence de résonance  $\nu$ , et  $h$  est la constante de Planck. L'excès de spin ayant une orientation parallèle au champ  $B_0$  comparativement au spin ayant une position antiparallèle génère l'apparition d'une aimantation nucléaire  $M$ , pouvant être représentée par un vecteur parallèle au champ magnétique (Figure I.1.).



**Figure I.1. :** Ensemble de moments magnétiques dans un champ magnétique  $B_0$  (cas de l'hydrogène) (Unité mixte INSERM - Université Joseph Fourier U594 )

Par la suite, l'application d'un champ magnétique alternatif  $B_1$  polarisé perpendiculairement au champ statique  $B_0$ , induit un mouvement de précession autour de  $B_0$ , ce qui entraîne une augmentation de la différence énergétique entre les spins. Le champ magnétique ressenti par le noyau n'est cependant pas le même que celui qui est appliqué. Les électrons circulant dans l'environnement près du noyau créent leur propre champ magnétique pouvant s'opposer au champ extérieur. L'énergie étant liée à la fréquence par la relation  $E = h\nu$ , l'énergie fournie par le champ ressenti par le noyau est absorbée par les spins lorsque la fréquence appliquée est égale à l'énergie entre les niveaux de spins. Il s'ensuit un saut du spin à un état énergétique supérieur (ex. spin  $+1/2$  à  $-1/2$ ). La fréquence à laquelle a lieu la transition, appelée fréquence de résonance ou de Larmor, est égale à

$$\nu = \nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

La perturbation engendrée par le champ  $B_1$  sur l'aimantation nucléaire  $M$  provoque un signal électrique de fréquence  $\nu_0$  détecté aux bornes d'une bobine entourant l'échantillon. Un ordinateur traite ce signal électrique qui est alors traduit sous forme de spectre. Les positions des pics d'absorption sur un spectre de RMN sont mesurées en déplacement chimique (chemical shift)  $\delta$  par rapport à une valeur de référence. L'intensité d'un pic d'absorption est donnée par l'aire totale sous le pic et permet de quantifier relativement le nombre de noyaux contribuant à chaque pic du spectre.

## **I.2. RMN sur des échantillons cellulaires**

Les mesures de RMN  $^{31}\text{P}$  sont surtout employées pour l'étude de processus biologiques de cellules intactes et même d'organismes entiers. Deux types de mesure sont utilisés pour l'analyse de systèmes biologiques. Alors que les méthodes *in vitro* emploient des extraits non vivants, les mesures de RMN *in vivo* forment un outil analytique non invasif et non destructif permettant l'étude en temps réel des métabolismes cellulaires. Isotope naturellement abondant, les mesures de RMN  $^{31}\text{P}$  peuvent servir à mesurer le pH intracellulaire, quantifier les métabolites (glucose-6-P, ATP, phosphate inorganique (Pi), phosphocréatine (PCr)), étudier les flux d'ions, mesurer des coefficients cinétiques ou encore explorer des voies cellulaires.

Plusieurs données sont disponibles dans la littérature afin d'identifier les pics observés sur les spectres RMN des échantillons de cellules mammifères (se référer au tableau suivant).

**Tableau II : Liste de composés phosphatés perçus sur des spectres de cellules ou d'organes de mammifères (Déplacements relatifs à 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)**

$\delta$ (ppm)	Abréviation	Nom du composé	Cellules
4-4.5	SP	Sucres phosphatés	<sup>1</sup> Muscles de bovins
3.68-4.5	PME	Phosphomonoesters (phosphorylcholine (PCho), Phosphorylethanolamine (PEth)) Glucose-6-phosphate, Fructose-1,6-biphosphate	<sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; <sup>2,5</sup> CHO; <sup>3</sup> BHK21 cells; <sup>4</sup> A549 cells
3-4	2,3 DPG	2,3-Diphosphoglycérate	<sup>1</sup> Érythrocytes humains
2.5	Pi	Phosphate inorganique	<sup>1</sup> Coeur perfusé de rat; Érythrocytes humains; <sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; <sup>2,5</sup> CHO; <sup>3</sup> BHK21 cells; <sup>4</sup> A549 cells
1	GPE (PdE)	Phosphodiester	<sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; CHO
0.5	GPC (PdE)	Glycerophosphorylcholine (Phosphodiester)	<sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; <sup>2,5</sup> CHO
-2.5	PCr	Phosphocréatine	<sup>1</sup> Coeur perfusé de rat; Muscles de bovins; <sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; <sup>2,5</sup> CHO
-5.0	$\gamma$ ATP	Adénosine triphosphate	<sup>1</sup> Coeur perfusé de rat; Érythrocytes humains; Muscles de bovins; <sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; <sup>2,5</sup> CHO; <sup>3</sup> BHK21 cells ( $\gamma$ NTP); <sup>4</sup> A549 cells ( $\gamma$ NTP)
-10.0	$\alpha$ ATP	Adénosine triphosphate	<sup>1</sup> Coeur perfusé de rat; Érythrocytes humains; Muscles de bovins; <sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; <sup>2,5</sup> CHO; <sup>3</sup> BHK21 cells ( $\alpha$ NTP); <sup>4</sup> A549 cells ( $\alpha$ NTP); <sup>5</sup> CHO
-10.1	NAD(H)	Nicotinamide adenine dinucleotide	<sup>5</sup> CHO
-10.8	dPdE	Diphosphodiester ex. uridine diphosphoglucose (UDPG), NDP Hexoses	<sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; CHO; <sup>3</sup> BHK21 cells; <sup>4</sup> A549 cells
-18.5	$\beta$ ATP	Adénosine triphosphate	<sup>1</sup> Coeur perfusé de rat; Érythrocytes humains; Muscles de bovins; <sup>2</sup> Cellules de rat C-6 glioma; CHO; <sup>3</sup> BHK21 cells ( $\beta$ NTP); <sup>4</sup> A549 cells ( $\beta$ NTP)

1. (Lundberg, Harmsen, Ho, et Vogel 1990)
2. (Gillies, Galons, McGovern, Scherer, Lien, Job et al. 1993)
3. (Cruz, Freitas, Alves, Moreira, et Carrondo 2000)
4. (Shankland, Livesey, Wiseman, et Krohn 2002)
5. (Barry, McGovern, Lien, Ashmore, et Gillies 1993)

Afin de valider la méthode d'analyse RMN, les pics d'un extrait intracellulaire de cellules CHO ont été identifiés par l'ajout de standard pur. La section suivante présente les résultats obtenus.

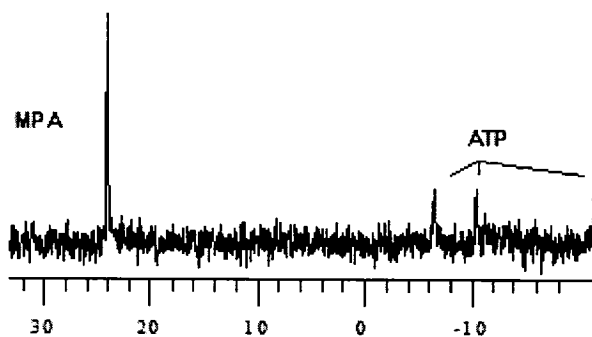
### **I.3. Mesure de résonance magnétique nucléaire**

Les mesures de RMN *in vitro* ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Varian Unity Inova 400 MHz (CA, Etats-Unis) muni d'une sonde 10-mm Broadband. L'acquisition des spectres a été réalisée à 161.839 MHz, avec un délai de 0,500 secondes et des pulsations de 45,0° à 298.15 K. Le temps d'acquisition a été fixé à 0,690secondes et la largeur du spectre à 20 000,0Hz. L'acquisition des spectres a été effectuée avec 10 000 scans, soit un temps d'acquisition de 3,3heures. Le découplage des protons a été continuellement appliqué par une séquence de pulsations WALTZ-16. Les données obtenues des mesures de RMN ont été transférées à un ordinateur personnel et traitées par le logiciel MestRe-C 2.3a. Les spectres ont été mis en phase et les lignes de base ont été corrigées à une largeur de 5Hz. Les mesures ont été effectuées grâce à la coopération de Jingkui Chen, associé de recherche.

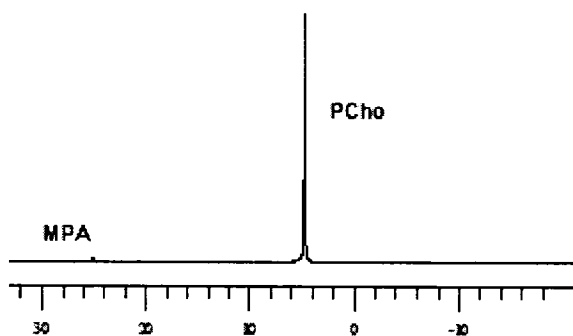


## **I.4. Résultats**

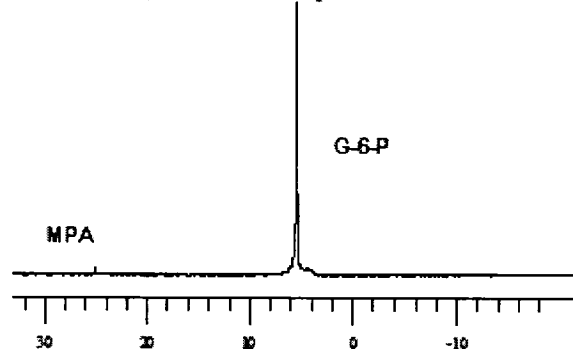
### *I.4.1. Identification des pics avec des composés purs*



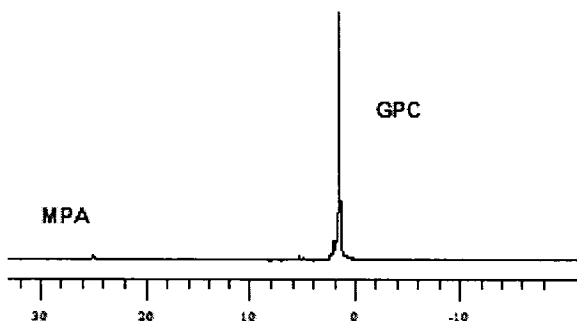
**Figure I.2. : Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of ATP in a free-phosphate buffer. MPA: Methyl phosphonate acid (reference); ATP : Adenosine Triphosphate**



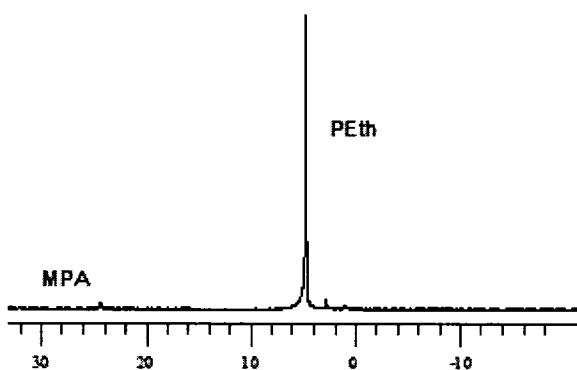
**Figure I.3. : Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of PCho in a free-phosphate buffer. MPA: Methyl phosphonate acid (reference); PCho : Phosphocholine**



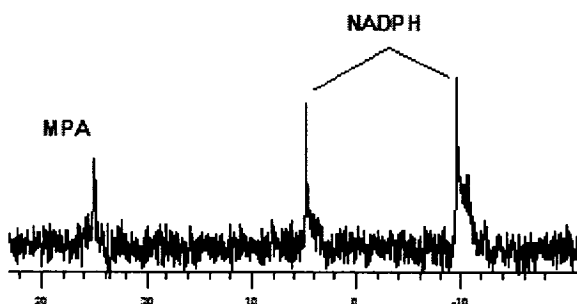
**Figure I.4.: Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of G6P in a free-phosphate buffer. MPA: Methyl phosphonate acid (reference); G6P : Glucose-6-Phosphate**



**Figure I.5.** Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of GPC in a free-phosphate buffer. MPA: Methyl phosphonate acid (reference); GPC : Glycerophosphorylcholine



**Figure I.6.** Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of PEth in a free-phosphate buffer. MPA: Methyl phosphonate acid (reference); PEth : Phosphoéthylamine

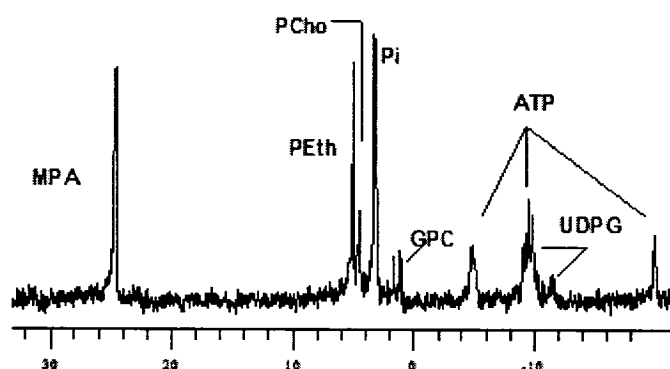


**Figure I.7. :** Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of NADPH in a free-phosphate buffer. MPA: Methyl phosphonate acid (reference); NADPH : Nicotiamine....

#### *1.4.2. Spectre de l'extrait cellulaire par RMN in vitro*

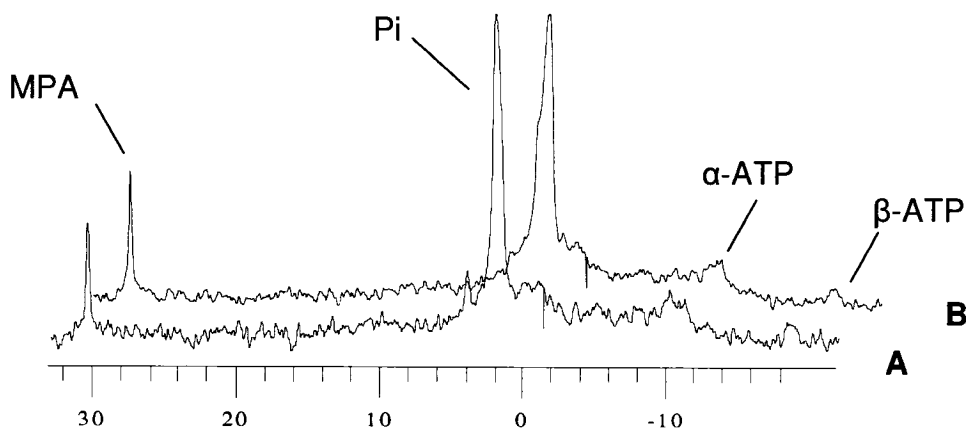
Un extrait cellulaire a été préparé à l'aide d'acide trichloroacétique et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  entre les analyses. Un faible volume de chaque composé standard a été ajouté

successivement à l'extrait cellulaire. L'augmentation d'un signal suite à l'ajout a permis l'identification des pics sur le spectre. On note l'absence de PCr (pic vers 2,5-3), l'absence ou la très faible présence de G-6-P (pic à 5). De plus, le NADPH se confond avec les pics d'ATP et d'UDPG.



**Figure I.8. :** Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of CHO cells (extract of approximately  $2,5 \times 10^8$  cells) after a four-day spinner flask culture. The spectrum was quickly acquired at 161,839MHz and 450 pulse at temperature of 298.15 K. The acquisition time was set to 0

#### *H.4.3. Spectre d'un échantillon vivant par RMN in vivo*



**Figure I.9. :** Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of live CHO cells (approximately  $3.8 \times 10^8$  cells) (spectrum B and C). The spectra were quickly acquired at 161,839MHz and 45° pulse at temperature of 298.15 K. The acquisition times were set to 0.69 sec and spectra widths were 20 kHz. The total acquisition time was of 12 minutes (spectrum A) and 36 minutes (spectrum B) respectively. MPA: Methylphosphonic Acid (reference); PEth: Phosphorylethanolamine; Pi: Inorganic Phosphate; ATP: Adenosine Triphosphate; UDPG: Uridine Diphosphoglucose; GPC: Glycerophosphorylcholine; PCho: Phosphocholine

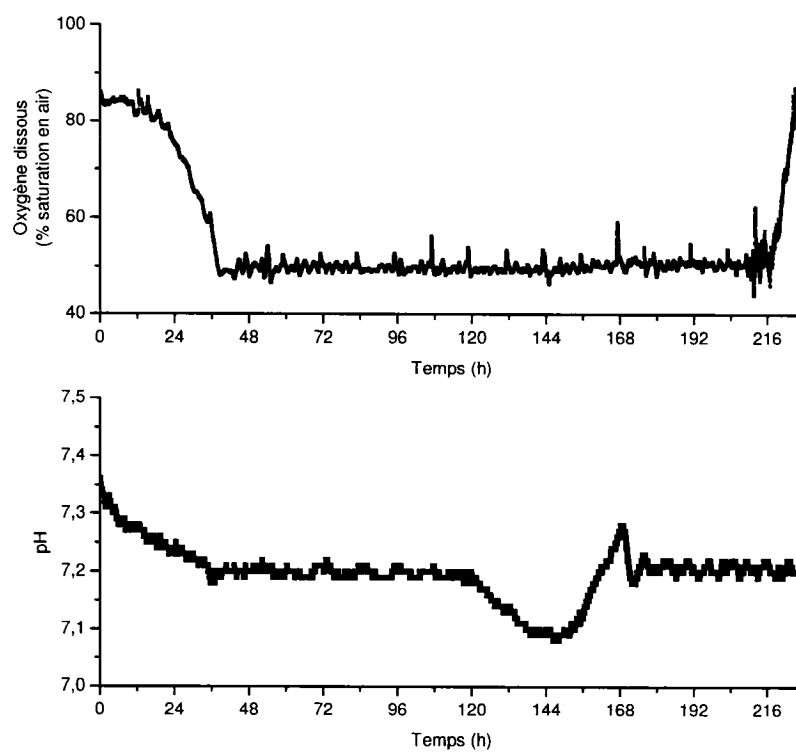
## **ANNEXE J : DONNÉES DE DÉBITS DE GAZ, PH ET O<sub>2</sub> DISSOUS POUR LES CULTURES EN RÉACTEUR**

Les débits gazeux (Air, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) ont été contrôlés par les débitmètres (mass-flow) placés sur chaque ligne de gaz. Des mesures de l'état de la culture dans le bioréacteur ont été réalisées à l'aide de sondes de pH, de température et de pourcentage d'oxygène dissous. Un contrôleur a été utilisé pour varier les débits gazeux afin de maintenir un pH supérieur à 7.15-7.2 et une concentration en oxygène dissous supérieure à 50%.

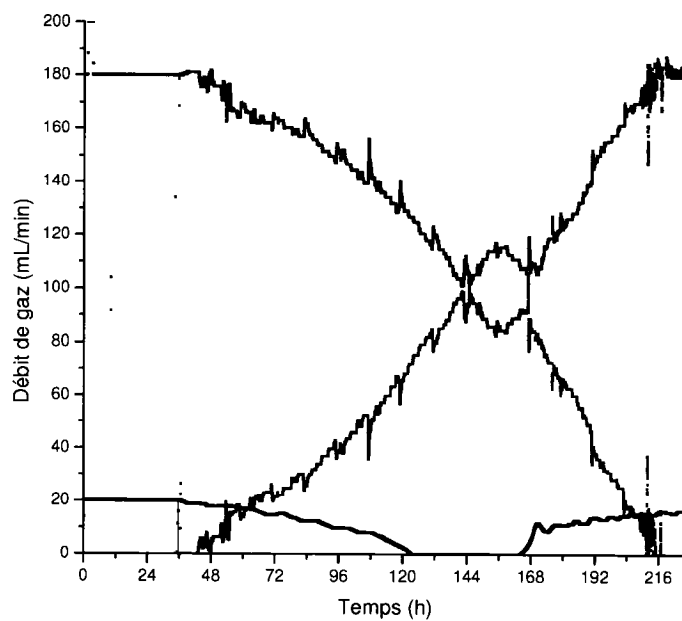
Les données de débits gazeux, de pH et d'oxygène dissous pour les cultures CTRL, NaBu-48h et NaBu-74h sont présentées dans cette annexe. La température étant maintenue à 37°C, les données de température n'ont pas été comptabilisées.

### **J.1. Culture CTRL**

Les Figures J.1. et J.2. présentent les variations en oxygène dissous, en pH et les débits gazeux. Vers 120h, le contrôle du pH par des variations au débit de CO<sub>2</sub> n'a plus été suffisant et le pH a chuté sous le point de consigne de 7.2. Un ajout de bicarbonate ou de NaOH aurait pu éviter cette chute de pH.



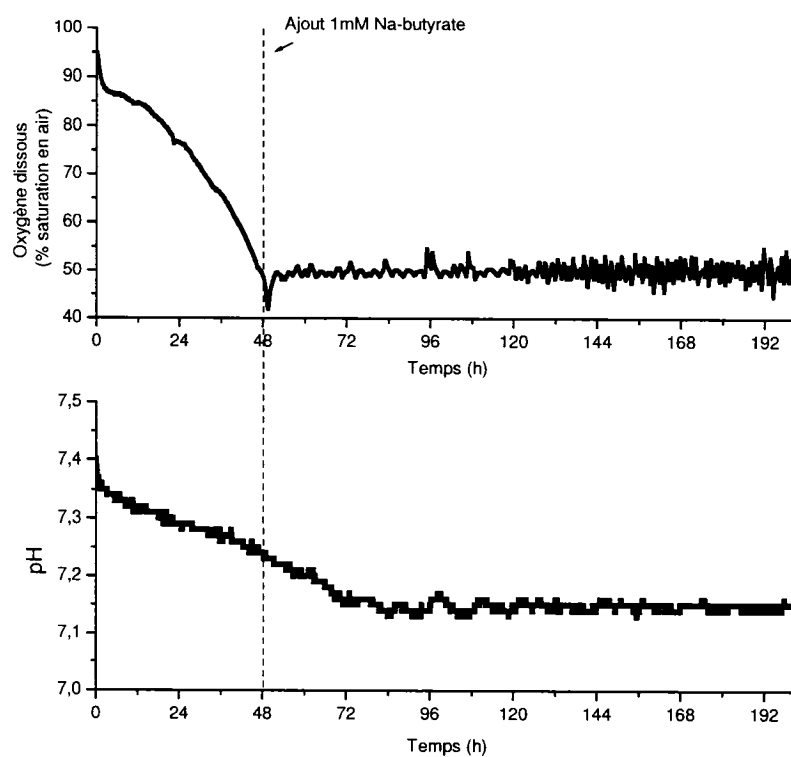
**Figure J.1. : Suivi de l'oxygène dissous et du pH durant la culture contrôle (CTRL).**



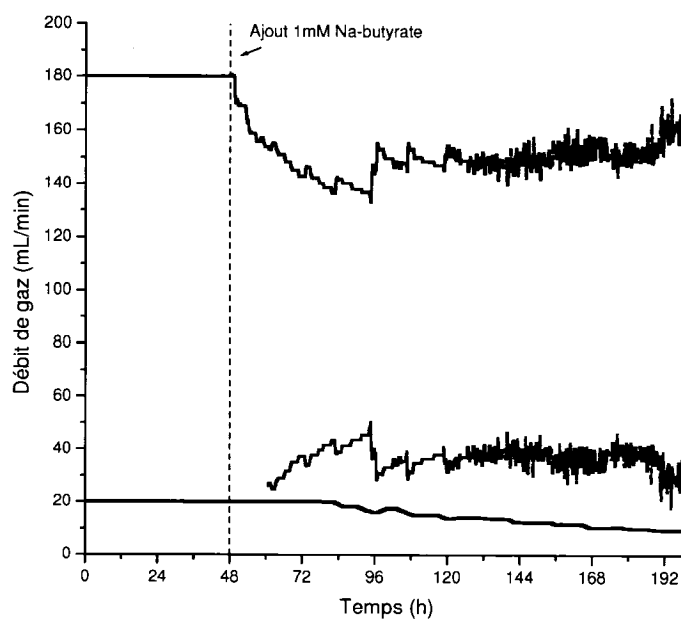
**Figure J.2. : Suivi des débits d'air, d'oxygène et de dioxyde de carbone durant la culture contrôle (CTRL). Air : bleu; O<sub>2</sub> : Rose; CO<sub>2</sub> : Noir.**

### **J.2. Culture NaBu-48h**

Les Figures J.3. et J.4. montrent les variations en oxygène dissous, en pH et les débits gazeux pour la culture avec ajout de butyrate de sodium à 48h.



**Figure J.3. : Suivi de l'oxygène dissous et du pH durant la culture NaBu-48h. L'ajout de butyrate de sodium a été fait après 48h de culture.**

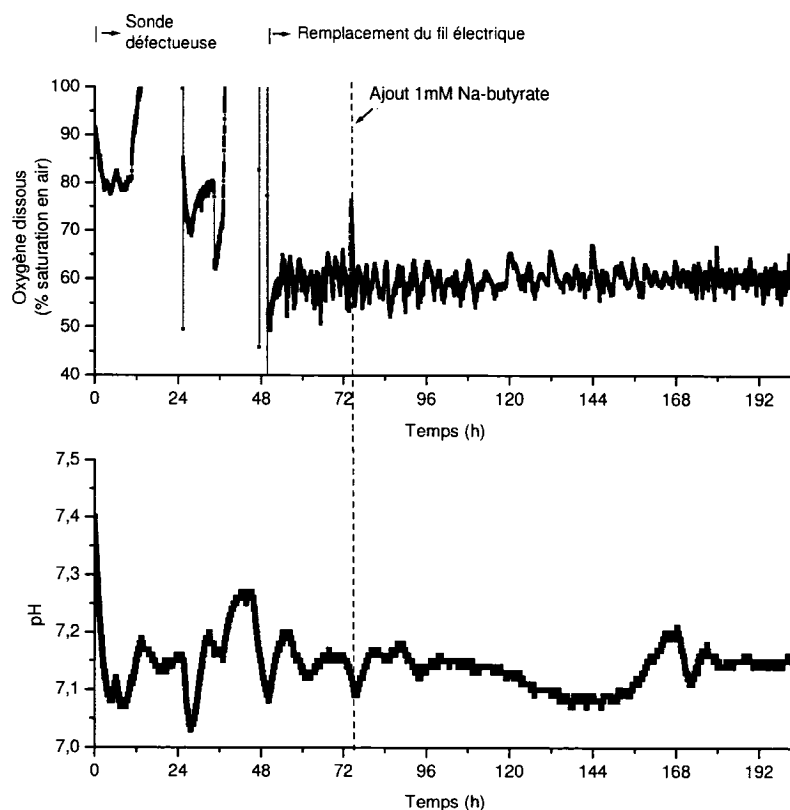


**Figure J.4. : Suivi des débits d'air, d'oxygène et de dioxyde de carbone durant la culture NaBu-48h. L'ajout de butyrate de sodium a été fait après 48h de culture. Air : bleu; O<sub>2</sub> : Rose; CO<sub>2</sub> : Noir.**

### **J.3. NaBu-74h**

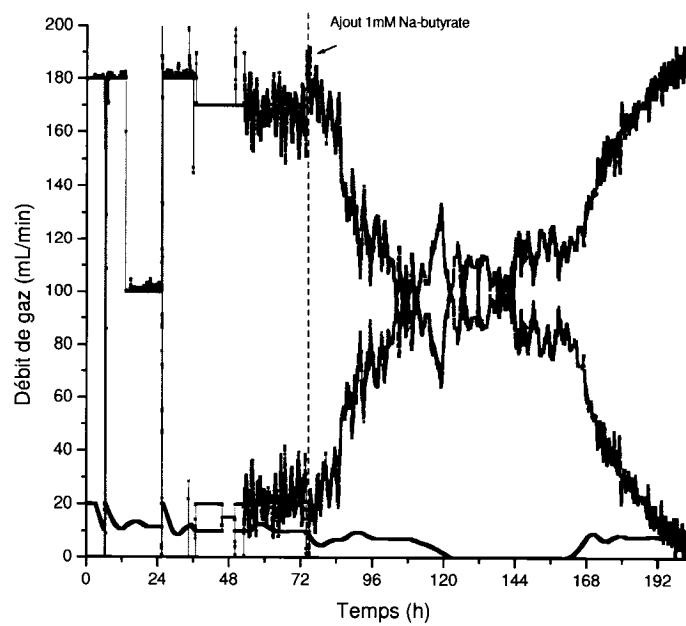
Les Figures J.5. et J.6. montrent les variations en oxygène dissous, en pH et les débits gazeux pour la culture avec ajout de butyrate de sodium à 74h.





**Figure J.5. : Suivi de l'oxygène dissous et du pH durant la culture NaBu-74h. L'ajout de butyrate de sodium a été fait après 74h de culture.**

Une défectuosité du fil électrique de la sonde à oxygène dissous a été remarquée dans les débuts de la culture. Le remplacement du fil environ 48h après l'amorce de la culture a permis d'avoir une sonde fonctionnelle. Toutefois, la calibration de la sonde n'était plus adéquate. Après la culture, une vérification de la calibration de la sonde dans de l'eau à 37°C permet d'estimer une surestimation d'environ 10% des mesures d'oxygène dissous présentées en comparaison aux valeurs réelles dans le bioréacteur.



**Figure J.6. : Suivi des débits d'air, d'oxygène et de dioxyde de carbone durant la culture NaBu-74h. L'ajout de butyrate de sodium a été fait après 74h de culture. Air : bleu; O<sub>2</sub> : Rose; CO<sub>2</sub> : Noir.**

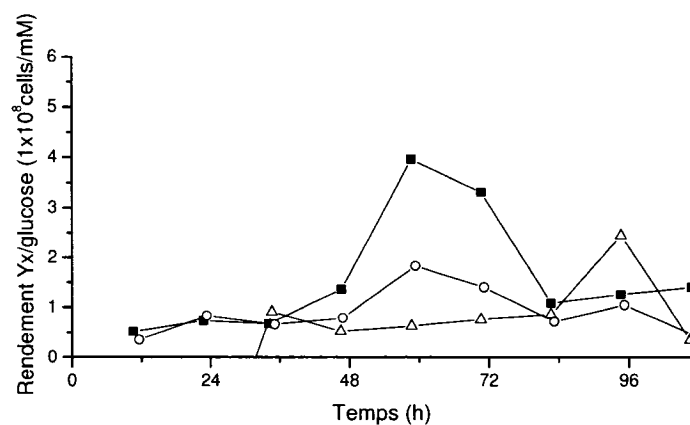
## **ANNEXE K : RENDEMENTS NUTRITIONNELS, ÉNERGÉTIQUES ET DE PRODUCTIVITÉ**

Cette annexe vient compléter l'analyse des résultats présentés dans le manuscrit.

### **K.1. Données nutritionnelles**

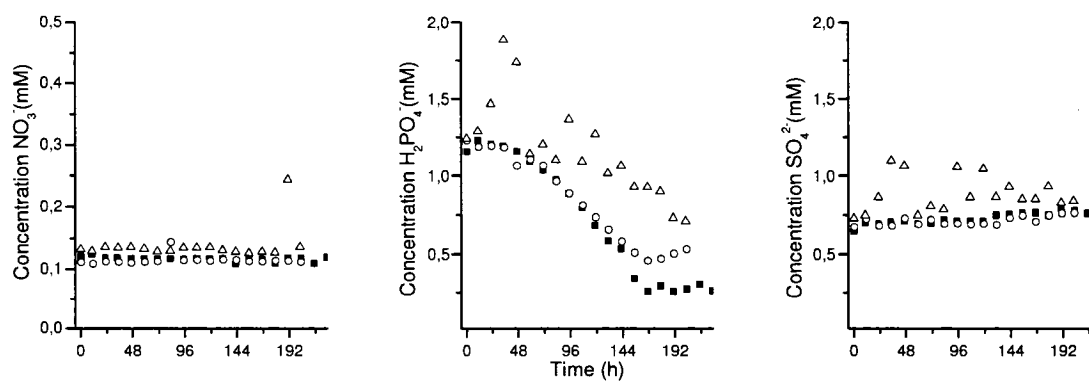
Les concentrations extracellulaires en glucose, glutamine, lactate et ammoniacque et la croissance ont été suivies pour les trois cultures. La formulation équilibrée du milieu de culture permet la consommation complète quasi-simultanée du glucose et de la glutamine présents dans le milieu et les niveaux en lactate et ammoniacque obtenus durant les cultures ne semblent pas être responsables de la mortalité cellulaire. L'arrêt de la croissance des CHO est observé pour des valeurs en lactate supérieures à 55mM (Ozturk, Riley, et Palsson 1992) et en ammoniacque supérieur à 6mM (Ozturk, Riley, et Palsson 1992). Il est également à noter que le taux de dégradation spontané de la glutamine a été estimé dans la littérature à 10% par jour, ce qui entraînerait une augmentation de 0,6mM ammoniacque par jour à 37°C dans le milieu (Tritsch et Moore 1962)

À partir des données nutritionnelles et de croissance, le rendement avant la phase stationnaire  $Y_{x/\text{glucose}}$  a été calculé par différence centrée (jusqu'à l'entrée en phase plateau des cultures perturbées).

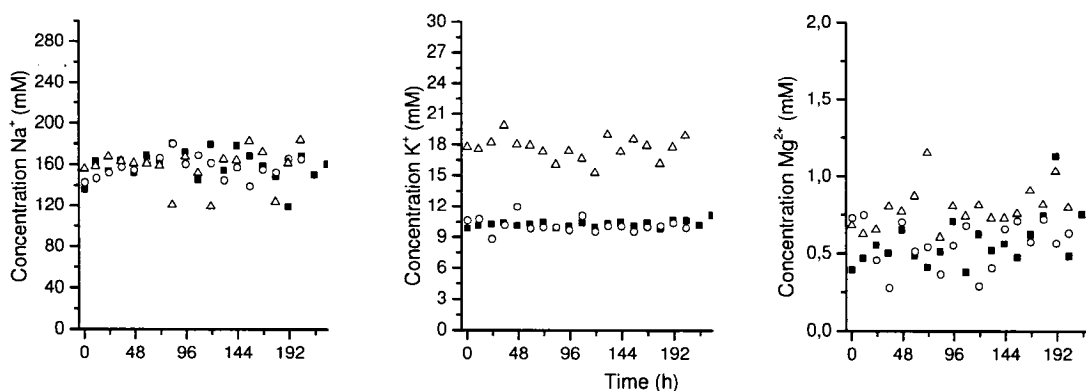


**Figure K.1.** Variation du rendement biomasse sur glucose au cours des cultures. CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○)

Les deux figures suivantes montrent les variations en anions et cations dans le milieu extracellulaire pour les cultures en bioréacteur. La teneur en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{K}^+$  des échantillons se situe sous à une valeur inférieure au plus petit standard ce qui ajoute à l'incertitude des mesures.



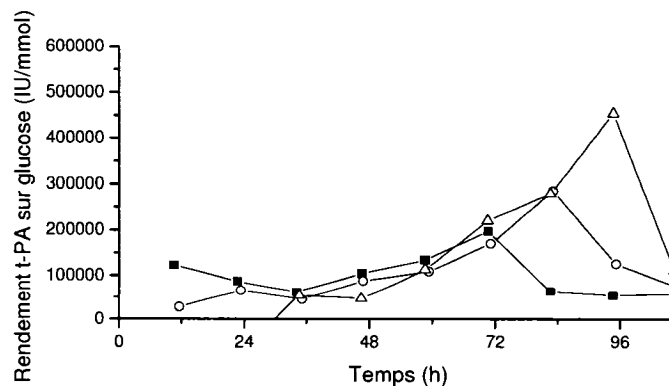
**Figure K.2.** Suivi des anions extracellulaires. CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○),



**Figure K.3.** Suivi des cations extracellulaires. CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○).

## K.2. Données de production

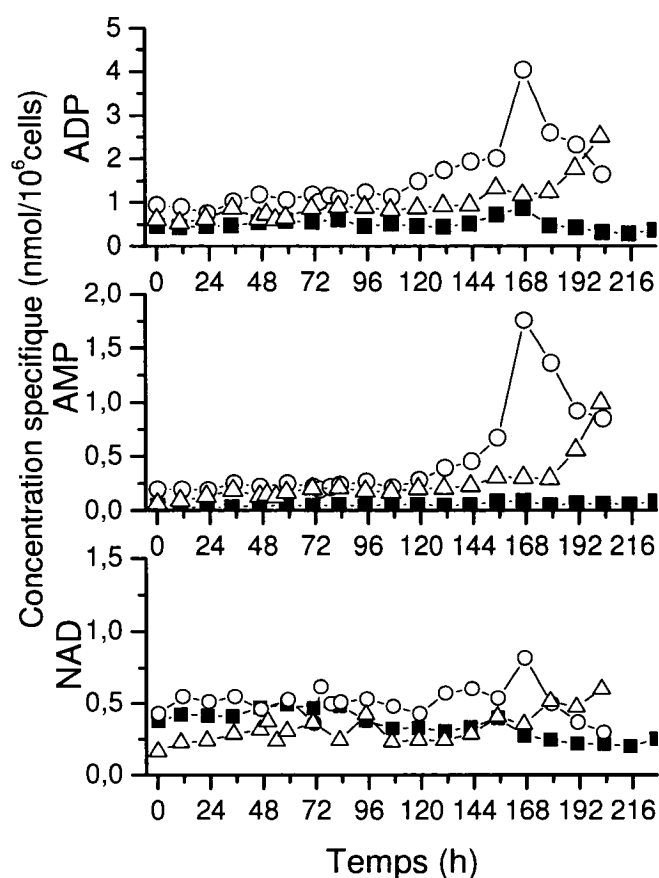
L'évolution du rendement produit sur substrat (calculé pour la période précédant les signes d'inactivation du t-PA) montre une plus grande production en t-PA par mole de glucose consommé pour la culture avec une stimulation hâtive par le butyrate de sodium.



**Figure K.4.** Variation du rendement produit sur glucose au cours des cultures (calculs points par points). CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○).

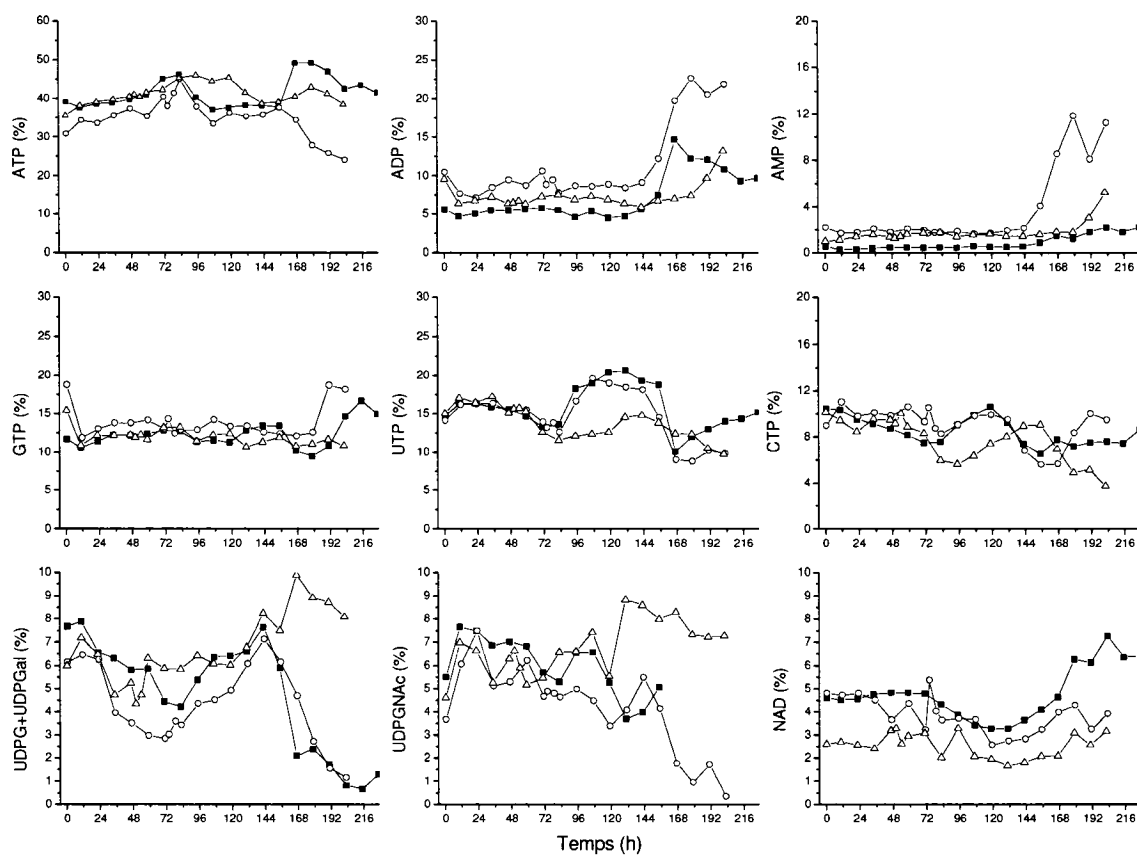
### K.3. Données énergétiques

La figure K.5. présente les variations en NAD, AMP et ADP. Les courbes des autres composés sont contenues dans le manuscrit de l'article.



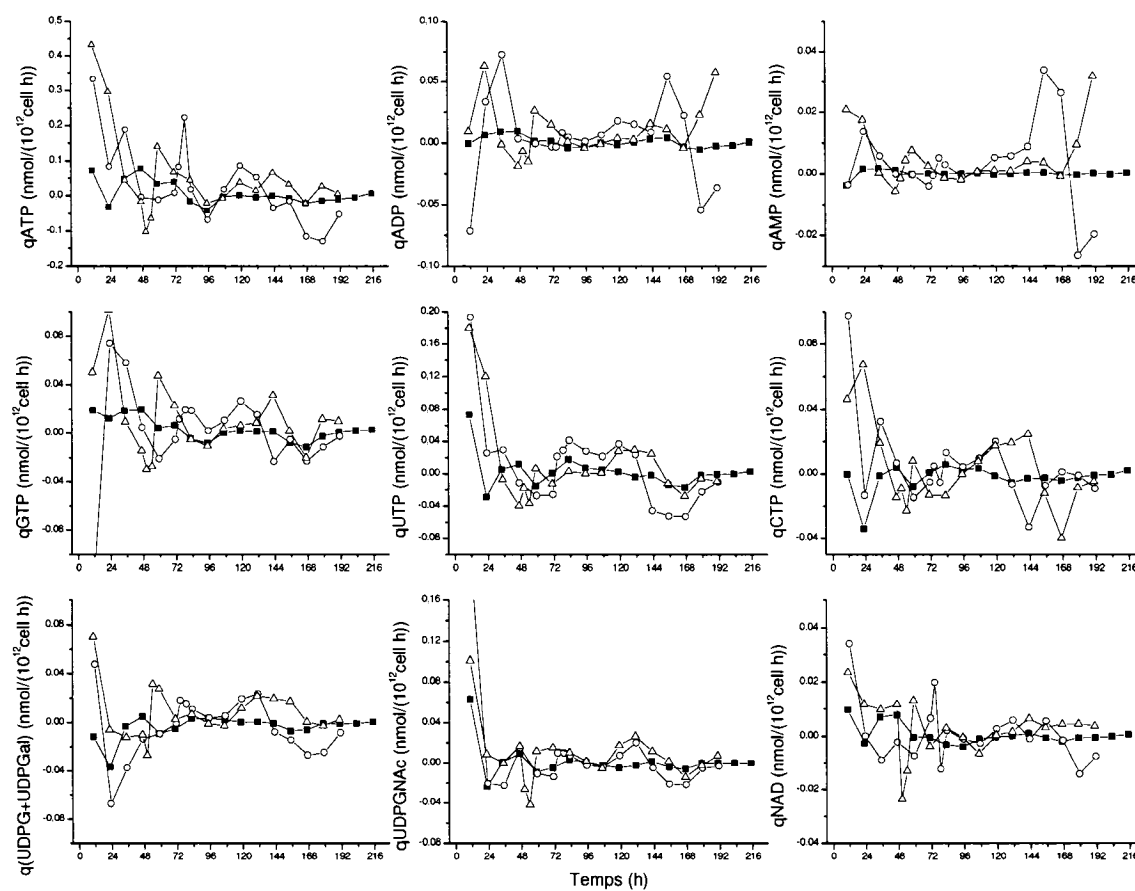
**Figure K.5.** Variation des concentrations spécifiques en ADP, AMP et NAD. CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○).

Les variations de chaque nucléotide sont présentées sur la figure K.6. en pourcentage par rapport à la somme des neuf nucléotides suivis.



**Figure K.6. Variation des pourcentages en nucléotides. CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○).**

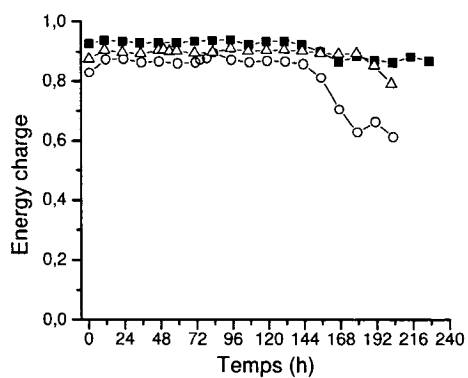
Les figures suivantes présentent les variations des taux de production des nucléotides.



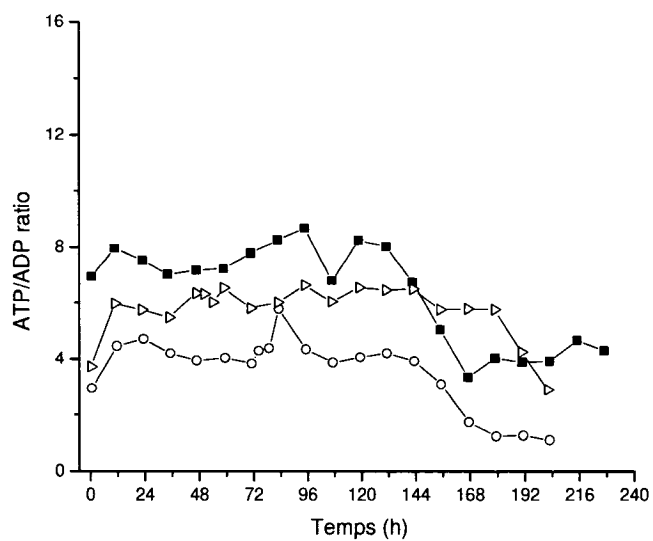
**Figure K.7. Variation des taux de production des nucléotides. CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○).**

Les figures suivantes montrent des ratios de nucléotides spécifiques.

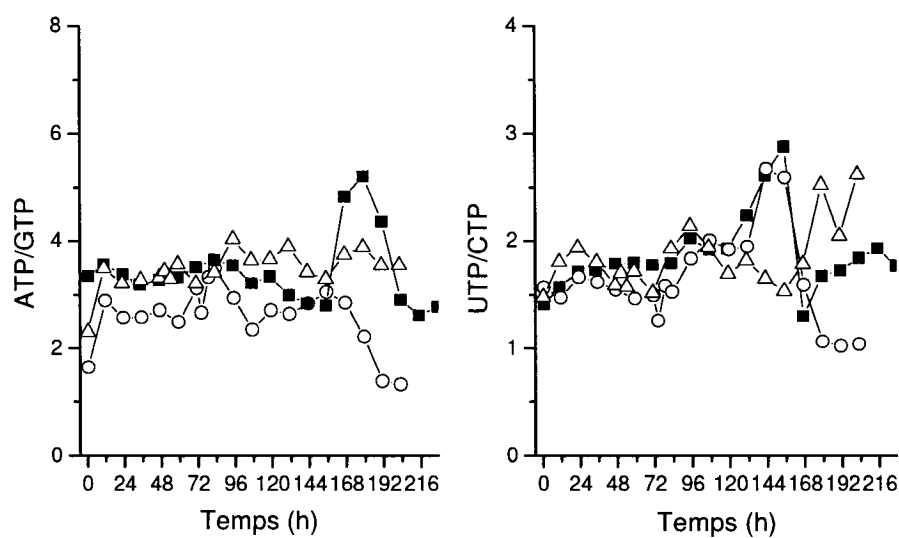




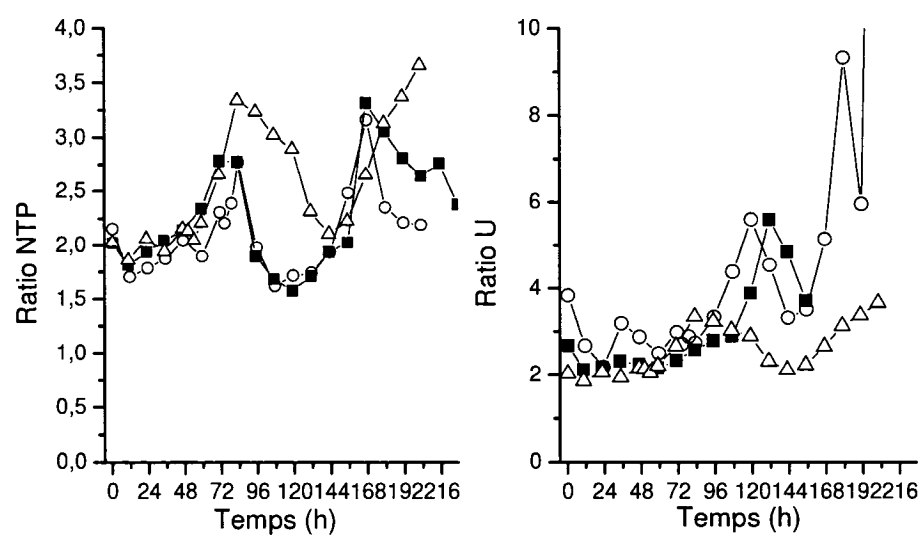
**Figure K.8. Variation de la charge énergétique. CTRL (■); NaBu-48h (Δ);NaBu-74h(○).**



**Figure K.9. Variation du ratio ATP/ADP. CTRL (■); NaBu-48h (Δ);NaBu-74h(○).**



**Figure K.10. Variation des ratios ATP/GTP et UTP/CTP. CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○).**



**Figure K.11. Variation des ratios NTP et U. CTRL (■); NaBu-48h (Δ); NaBu-74h (○).**